

Université de Montréal

**L'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation
des progéniteurs myéloïdes**

par

Irina Cristina Helici

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M. SC.)

Août 2009

©Irina Cristina Helici, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation
des progéniteurs myéloïdes**

présenté par :

Irina Cristina Helici

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Gregory Emery	Président - Rapporteur
Dr. Denis Claude Roy	Directeur de recherche
Dr. Janos G. Filep	Codirecteur
Dr. Martin Guimond	Membre du jury

SOMMAIRE

La surexpression rétrovirale du facteur de transcription HOXB4 résulte en une expansion sélective des cellules souches hématopoïétiques (CSH) *in vitro* et *in vivo* et ce, sans induire de leucémie. Par contre, la demi-vie intracellulaire de la protéine est de seulement une heure et le fait que la protéine disparaît du milieu de culture après environ 4 heures représente un obstacle majeur à l'utilisation clinique de la protéine HOXB4. Trois mutants HOXB4 ayant une substitution d'un seul acide aminé (AA) parmi les 31 premiers AA ont démontré une augmentation de la stabilité de la protéine. Nous avons donc évalué l'effet de HOXB4 et de ses trois mutants sur la production de cellules progénitrices myéloïdes. L'expression ectopique de HOXB4 sauvage (s-HOXB4) et HOXB4 mutant (m-HOXB4) a un effet comparable sur la fréquence des cellules progénitrices myéloïdes en essai clonogénique. Par contre, la capacité de prolifération des cellules progénitrices myéloïdes qui surexpriment s-HOXB4 et 1423 m-HOXB4 a été supérieure à celle des cellules contrôles (GFP seul) et des deux autres mutants. De plus, malgré le fait que toutes les variantes de HOXB4 confèrent une capacité d'autorenouvellement similaire aux cellules progénitrices multipotentes (GEMM), la production des progéniteurs granulocytaires (CFU-G) est compromise lorsque les cellules surexpriment 1426 et 1427 m-HOXB4. D'autre part, la densité cellulaire des colonies myéloïdes qui surexpriment ces deux mutants est diminuée, ce qui suggère que ces mutations ont non seulement augmenté sa stabilité, mais potentiellement affecté certaines fonctions biologiques de s-HOXB4. Enfin, 1423 m-HOXB4

semble n'avoir perdu aucune fonction de s-HOXB4 dans nos évaluations clonogéniques *in vitro*, ce qui fait de ce mutant une molécule intéressante pour des applications cliniques d'expansion des cellules progénitrices hématopoïétiques.

Mots clés : HOXB4 sauvage et les mutants HOXB4, les progéniteurs myéloïdes.

ABSTRACT

Over-expression of the homeobox transcription factor HOXB4 results in a selective expansion of HSC *in vitro* and *in vivo*. However, the intracellular half-life of the protein is only one hour, which represents an important obstacle for its clinical use. Three HOXB4 mutants with single amino acid (AA) substitution in the first 31 AA have demonstrated increased intracellular stability of the protein. We evaluated the effect of wild type (wt) and mutant (m) HOXB4 on expansion and differentiation of myeloid progenitors. Ectopic expressions of wt- and m- HOXB4 had a comparable effect on the frequency of myeloid progenitors in semi-solid assay. However, the proliferative capacity of myeloid progenitors expressing wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 was considerably better than that of control (GFP only) and other two mutants. Additionally, while all HOXB4 variants conferred similar self-renewal capacity to multipotent (GEMM) progenitors, the production of single-lineage granulocytic progenitors (CFU-G) was severely compromised when cells were expressing 1426 and 1427 m-HOXB4. Conversely, the cellularity of myeloid colonies was also diminished with these mutants suggesting, that both mutations affect certain biologic function(s) of wt-HOX4 in addition to increasing its stability. On the other hand, 1423 m-HOXB4 did not seem to lose any wt-HOXB4 functions tested in *in vitro* assays making this mutant an interesting target for further investigation.

Key words: wild type and mutated HOXB4, myeloid progenitors.

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique.....	2
1.2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) autologue.....	4
2. L'hématopoïèse.....	5
2.1. La niche.....	6
2.2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	8
2.2.1. Les marqueurs de CSH.....	8
2.3. Les progéniteurs hématopoïétiques.....	10
2.3.1. Les progéniteurs myéloïdes.....	10
2.3.2. Les progéniteurs lymphoïdes.....	11
3. Les sources de cellules souches hématopoïétiques.....	13
3.1. La moelle osseuse.....	13
3.2. Les cellules du sang périphérique mobilisé.....	13
3.3. Le sang de cordon ombilical (SC).....	14
4. L'expansion ex vivo de cellules souches hématopoïétiques.....	15
5. Les gènes HOX.....	16
5.1. Le rôle des gènes HOX dans l'hématopoïèse.....	16
6. HOXB4.....	18

6.1. La surexpression rétrovirale de HOXB4 va augmenté le nombre de CSH <i>in vivo</i>	18
6.2. La surexpression rétrovirale de HOXB4 augmente le nombre de CSH <i>in vitro</i>	19
6.3. HOXB4 comme une protéine recombinante va augmenté le nombre de CSH <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	20
6.4. La protéine recombinante HOXB4 a la capacité d'augmenter le nombre de CSH humaines <i>in vitro</i>	21
6.5. HOXB4 n'est pas essentielle pour l'hématopoïèse définitive.....	22
6.6. Les cofacteurs de HOXB4 et leurs rôles dans l'hématopoïèse.....	23
7. La leucémie et le rôle des gènes HOX.....	26
8. Les gènes HOX et les cellules souches leucémiques.....	28
9. Description du projet de maîtrise.....	30
9.1. Mise en contexte.....	30
9.2. L'hypothèse et les objectifs de ce projet.....	31
9.3. Procédure expérimentale et résultats.....	32
 ARTICLE.....	 34
Contributions of the authors.....	36
Abstract.....	37
Introduction	38
Materials and Methods.....	40
Results.....	43

Discussion.....	49
Figure Legends.....	53
Figure 1A.....	58
Figure 1B.....	59
Figure 1C.....	60
Figure 2.....	61
Figure 3.....	62
Figure 4A.....	63
Figure 4B.....	64
Figure 5A.....	65
Figure 5B.....	66
Figure 6.....	67
Figure 7A.....	68
Figure 7B.....	69
Reference List.....	70
 DISCUSSION DES RÉSULTATS.....	 74
10. Discussion.....	75
10.1. Pertinence du projet.....	75
10.2. But du projet et résultats obtenus.....	76
11. L'effet de HOXB4 sur l'expansion les progéniteurs myéloïdes <i>in vitro</i>	78

12. Les progéniteurs GEMM possèdent une plus grande capacité de s'autorenouveler quand ils surexpriment HOXB4 sauvage ou son mutant 1423.....	81
13. Conclusions	87
14. Perspectives.....	89
Reference List.....	90

LISTE DES SINGLES ET ABRÉVIATIONS

AA : amino acid

ALA : Alanine

ADN : acide deoxyribonucleic

AGM : Aorte-Gonade-Mésonéphros

BFU-E : «Burst Forming Unit Erythrocytes»

BMP : « Bone Morphogenic Proteins »

CFC : « Colony Forming Cells »

CFU-E : «Colony Forming Unit Erythrocyte»

CFU-GEMM : «Colony Forming Unit Granulocyte–Erythrocyte–Macrophage–Megakaryocyte»

CFU-GM : «Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage»

CFU-G : «Colony Forming Unit Granulocyte»

CFU-M : «Colony Forming Unit Macrophage»

CFU-Meg : «Colony Forming Unit Megakaryocyte»

CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité

CRU : Competitive Repopulation Units

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSL : cellule souche leucémique

G-CSF : «Granulocyte Colony Stimulating Factor»

GM-CSF : «Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor»

GCSH : Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

GFP : Green Fluorescent Protein

GVHD : maladie du greffon contre l'hôte (« Graft Versus Host Disease »)

Flt-3 : Fetal liver tyrosine kinase -3

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HLA : « Human Leukocyte Antigen »

hematopoietic stem cells HSC

IL-3 : Interleukine-3

IL-6 : Interleukine-6

IL-11 : Interleukine-11

LEU : Leucine

LMA : leucémie myéloïde aiguë

LTC-IC : « Long Term Culture Initiating Cells »

Lymphocytes NK : Lymphocytes «Natural Killer»

m-HOXB4 : HOXB4 mutant

MLL : Mixed Lineage Leukemia

MO : Moëlle Osseuse

miHA : antigènes mineurs d'histocompatibilité

NOD- SCID : Non Obese Diabetes- Severe Combined Immunodeficiency

SLAM : «Signaling Lymphocyte Activation Molecule»

s-HOXB4 : HOXB4 sauvage

SC : Le sang de cordon ombilical

SCF : « Stem Cell Factor »

Shh : «Sonic Hedgehog»

TALE : Three-Amino-Acid Loop Extension

TCR β : T cell receptor beta chain

TGF β : « Transforming Growth Factor β »

TPO : Trombopoïétine

Tyr : Tyrosine

Wt-HOXB4 : wild type HOXB4

REMERCIEMENTS

Je désire remercier le Dr. Denis Claude Roy, mon directeur et Dr. Janos G. Filep, mon co-directeur pour l'opportunité de continuer mes études dans la recherche et aussi pour leur support et leur confiance.

Je remercie Dr. Gorazd Krosi pour son support intellectuel, sa disponibilité et son aide inestimable. Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide, pour leur expérience et surtout leur amitié.

Je tiens à remercier Mark, mon fils et Istvan Vicsai, mon mari ainsi que les membres de ma famille pour leur compréhension, leur support et leur confiance au cours de mes études.

Cet mémoire est dédié à mon fils, Mark, avec amour.

INTRODUCTION

1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Depuis de nombreuses années, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques constitue une thérapie de choix pour traiter une variété de maladies malignes, particulièrement les leucémies et les lymphomes¹. Ce type de traitement a aussi un potentiel intéressant pour traiter d'autres maladies tel le cancer du rein, du sein, certains sarcomes, les neuroblastomes et les tumeurs germinales.² La transplantation médullaire constitue ainsi une indication pour le traitement des maladies héréditaires ou immunologiques comme le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie et l'arthrite rhumatoïde sévère³. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est une procédure visant à remplacer les cellules de la moëlle osseuse (MO) du patient par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) saines. Cette intervention est précédée par l'administration de fortes doses de chimiothérapie et de radiothérapie visant à éliminer les cellules malignes et aussi à favoriser la prise du greffon. La GCSH peut être allogénique ou autologue.

1.1. La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques

Dans le cas de la greffe allogénique, le donneur et le receveur peuvent être apparentés ou non. Lorsque le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques, la GCSH est syngénique alors que lorsqu'ils sont apparentés et identiques au niveau des antigènes d'histocompatibilité majeurs (HLA), la greffe est dite génoidentique. Il est possible que les donneurs et receveurs aient les mêmes antigènes HLA en

commun à la suite d'une analyse phénotypique, mais que les gènes eux ne soient pas identiques. On dit alors qu'il s'agit d'une greffe phénotypiquement identique mais non génotypiquement identique. Il est possible de réaliser une greffe génotypiquement identique avec un donneur familial. Lors de greffes avec un donneur non apparenté, la greffe est habituellement phénotypiquement identique, mais le degré d'appariement génotypique est très variable. Lorsque le donneur et le receveur ne présentent des antigènes HLAs appariés et génotypiquement communs que pour un seul des chromosomes (la moitié des gènes HLA du receveur), on dit que la greffe médullaire est haplo compatible⁴. Le système d'histocompatibilité est très important pour établir la compatibilité pour les couples donneur-receveur et diminuer les risques associés à la greffe de moelle osseuse pour les receveurs. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë ou chronique et le rejet du greffon constituent les risques majeurs suite à une GCSH.

La GVHD est la principale complication à la suite d'une greffe de CSH allogéniques⁵⁻¹⁰. La GVHD aiguë est la complication la plus fréquente et mortelle à survenir suite à une greffe de MO allogénique et constitue un facteur de risque pour le développement de la GVHD chronique. La GVHD chronique est généralement moins mortelle et affecte environ 50% des patients qui survivent à la transplantation médullaire¹¹. La GVHD est dite aiguë quand la maladie survient au cours des premiers 100 jours de la greffe. Les signes cutanés sont les signes les plus précoces et les plus constants de la GVHD aiguë. Les réactions aiguës sont liées à des phénomènes cytotoxiques contre les kératinocytes, qui sont les cellules épithéliales cibles¹²⁻¹⁴. La GVHD est une maladie qui est causée par une activation des cellules

du donneur contre les cellules de l'hôte¹⁵. La pathogénèse de la GVHD est complexe: bien que le donneur et le receveur soient généralement compatibles sur le plan des antigènes majeurs d'histocompatibilité, il existe des différences sur le plan des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA). Cette incompatibilité conduit à l'activation de lymphocytes T du donneur. Les lymphocytes T activés, la production de diverses cytokines et aussi le recrutement de cellules effectrices causent des dommages à une variété de tissus et d'organes (la peau, le foie, les muqueuses, le tube digestif, les poumons, etc.)¹⁵.

1.2. La greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques (GCSH)

Dans le cas de la GCSH autologue, les cellules du greffon proviennent du patient. Les cellules sont généralement prélevées et congelées avant l'administration de la chimiothérapie intensive et de la radiothérapie au patient. Cette intervention est utilisée pour traiter des maladies comme les leucémies myéloïdes et lymphoblastiques aiguës, le myélome multiple, les lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens, le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, ou l'arthrite rhumatoïde¹⁶. L'avantage de cette procédure est la compatibilité puisque ce sont les propres cellules du receveur. Ainsi, il n'y a pas de risque de rejet ou de GVHD. Le désavantage est la possibilité que le greffon soit contaminé par des cellules tumorales du patient mais également que le nombre de cellules souches soit insuffisant, puisque la MO peut avoir été endommagée par les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie.

2. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse permet d'assurer la production adéquate des cellules matures du sang à partir de CSH. Chez une personne adulte en bonne santé, entre 10^{11} et 10^{12} nouvelles cellules sanguines sont produites quotidiennement¹⁷.

Les CSH se développent pendant l'embryogenèse par une succession d'évènements complexes qui impliquent des lieux anatomiques multiples dont le sac vitellin, l'aorte-gonade-mésonephros (AGM), le foie fœtal, le placenta¹⁹.

L'hématopoïèse embryonnaire commence après la gastrulation chez les souris, quand des précurseurs mésodermiques plus spécialisés (hémangioblastes) vont se différencier en cellules sanguines ou vasculaires. Ces précurseurs vont migrer vers le sac vitellin et vont donner naissance aux globules rouges embryonnaires²⁰. Les CSH en cours de développement ont besoin d'une période de maturation qui est nécessaire pour survivre dans leur future niche. Ensuite, les CSH vont migrer dans le foie fœtal ou elles vont s'expander rapidement afin d'établir la réserve de CSH nécessaires pour la vie postnatale²¹. En même temps, l'hématopoïèse définitive commence dans le foie fœtal et se déroule dans la moelle osseuse, où la grande majorité des CSH sont dans la phase G0 du cycle cellulaire¹⁹.

2.1. La niche

La niche hématopoïétique de la MO représente le microenvironnement qui supporte l'autorenouvellement et la différenciation des CSH. Plusieurs études ont démontré que les ostéoblastes (cellules d'origine mésenchymateuse qui se trouvent à la surface interne des os) sont une des composantes essentielles de la niche²². Par exemple, les souris mutantes pour lesquelles la voie BMP (« Bone Morphogenic Proteins ») est endommagée vont avoir un plus grand nombre d'ostéoblastes et de CSH^{23;24}.

Les BMPs sont des facteurs de croissance et des cytokines qui jouent un rôle important dans la formation des os et des cartilages. Les BMP 2 à 7 appartiennent à la grande famille de TGF β et elles ont des fonctions importantes dans le développement des organes comme le cœur, les cartilages, le système nerveux central et les os. En plus, les BMPs sont des régulateurs importants pendant le développement de l'hématopoïèse pour plusieurs espèces²⁵⁻²⁸. Finalement, l'augmentation de plusieurs facteurs comme Jagged1, le ligand de Notch1, et N-cadhérine, qui sont produits par les ostéoblastes, démontre une corrélation avec l'augmentation du nombre de CSH^{23;24;29}.

Par ailleurs, des études plus récentes ont démontré que les CSH demeurent quiescentes grâce à des interactions avec la thrombopoïétine produite par les ostéoblastes³⁰. Une autre étude *in vivo* démontre que la déplétion en ostéoblastes cause une diminution du nombre de cellules souche dans la MO accompagné d'une augmentation de l'hématopoïèse extramédullaire³¹.

D'autres études parlent d'une niche vasculaire³² où la chémokine CXCL12 régulerait la migration des CSH vers les cellules vasculaires.. Les CSH ont un rôle de soutien pour les vaisseaux sanguins et les vaisseaux sanguins servent à conduire les cellules hématopoïétiques matures vers la circulation sanguine périphérique. La niche vasculaire est aussi le site où les cellules progénitrices, surtout les cellules progénitrices de mégacaryocytes, se différencient³³.

Finalement, toutes ces études suggèrent que les CSH résident dans plusieurs endroits de la moelle osseuse et que les différentes fonctions des CSH peuvent être dépendantes de ces localisations. En plus, la niche ostéoblastique et la niche vasculaire interagissent ensemble¹⁹. Il devient alors évident que les interactions avec la niche sont très importantes pour le succès des transplantations de CSH³⁴.

Finalement, il a été démontré que des dommages à la niche hématopoïétique pouvait prédisposer à des maladies hématopoïétiques sérieuses (comme des syndromes myéloprolifératifs)^{35;36}. Les syndromes myéloprolifératifs sont considérés liés de façon intrinsèque aux CSH, et maintenant plusieurs études semblent indiquer que la niche hématopoïétique pourrait jouer un rôle important dans le développement de ces maladies. En effet, Walkley et al^{35;36} ont démontré que la perte d'un des récepteurs majeurs de la vitamine A, RAR γ , prédisposait à un syndrome myéloprolifératif induit par le microenvironnement.

2.2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Toutes les cellules sanguines matures sont générées à partir des CSH et des cellules progénitrices qui en découlent³⁷. Les CSH sont des cellules considérées comme ayant la capacité unique de générer des cellules matures de toutes les lignées: érythrocytaires, leucocytaires et plaquettaires^{38;39} et sont les seules cellules capables de reconstituer à long terme tout le système hématopoïétique³⁷. De plus, elles sont capables d'autorenouvellement, ce qui permet de maintenir constant le nombre des CSH multipotentes, ainsi que de se différencier en cellules progénitrices pluripotentes en réponse à un signal exogène¹⁷. L'hématopoïèse est un processus qui permet l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation⁴⁰. On retrouve les CSH en majorité dans la MO, mais aussi dans le sang, dans le sang de cordon ombilical ainsi que dans plusieurs autres organes comme le foie et la rate⁴¹. Dans la majorité des organes, les CSH sont quiescentes mais elles deviennent actives dans une situation où il y a une pénurie de cellules hématopoïétiques.

2.2.1. Les marqueurs de CSH

Les CSH sont identifiées par l'absence de marqueurs des différentes lignées hématopoïétiques (lin-), par la rhodamine 123 (rho-low)⁴² ou Hoechst 33342^{42;43} et par la présence de divers marqueurs antigéniques exprimés sur leur surface comme: CD34, CD90, CD133, CD105, CD45 et c-kit^{44;45} (il est cependant impossible actuellement de générer des populations pures de CSH). (Tableau I)

CSHs murines	CSHs humaines
CD34 ^{lo/-} SCA-1 ⁺ Thy1.1 ^{+/lo} c-kit ⁺ lin ⁻	CD34 ⁺ CD59 ⁺ Thy1/CD90 ⁺ c-kit/CD117 ⁺ lin ⁻
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻ (SLAM) ⁴⁶	

Tableau I. Les marqueurs de CSH⁵⁵

La population des cellules lin⁻/SCA-1⁺/ c-kit⁺ est appelée le compartiment LSK chez la souris (100 cellules LSK sont suffisantes pour une reconstitution à long terme dans des souris irradiées létalement⁵⁴). Cependant, ces marqueurs ne permettent pas de reconnaître toutes les CSH⁴⁰. Chez les souris, on peut distinguer les CSH des cellules progénitrices grâce à la molécule SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule). (Tableau II)

Les cellules souches hématopoïétiques	Les cellules progénitrices multipotentes	Les cellules progénitrices déjà engagées dans une lignée
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻	CD150 ⁻ CD48 ⁻ CD244 ⁺	CD150 ⁻ CD48 ⁺ CD244 ⁺

Tableau II. Les marqueurs SLAM chez les souris⁴⁶

2.3. Les cellules progénitrices s hématopoïétiques

Les CSH se différencient en cellules progénitrices hématopoïétiques pluripotentes qui ont la capacité de différenciation et de maturation qui va permettre d'assurer la présence dans le sang d'un nombre adéquat de cellules matures. Les cellules progénitrices pluripotentes peuvent s'engager dans deux lignées distinctes : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde⁴⁷.

2.3.1. Les cellules progénitrices myéloïdes

La lignée myéloïde donne naissance aux granulocytes, monocytes, érythrocytes et plaquettes.

La cellule qui mène à la formation d'une « unité formant une colonie – granulocyte, érythrocyte, monocyte/macrophage, mégacaryocyte » ou CFU-GEMM représente le progéniteur myéloïde le plus primitif et possède la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes. Les GEMM (« Colony Forming Unit Granulocyte–Erythrocyte–Macrophage–Megakaryocyte ») peuvent se différencier en CFU-GM (« Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage ») qui se divise ensuite en deux, soit les CFU-G (« Colony Forming Unit Granulocyte ») qui donne naissance aux granulocytes et CFU-M (« Colony Forming Unit Macrophage ») qui donne naissance aux monocytes. Les granulocytes vont éliminer les agents pathogènes par phagocytose et digestion, alors que la fonction principale des macrophages est de présenter l'antigène et de sécréter des cytokines.

Les CFU-GEMM peuvent également se différencier en BFU-E⁴⁸ (« Burst Forming Unit Erythrocytes ») qui ensuite se différencie en CFU-E (« Colony Forming Unit Erythrocyte »). La CFU-E, après son processus de maturation, donne naissance aux érythrocytes qui permettent le transport de l'oxygène dans le sang. Finalement, la CFU-GEMM se différencie en CFU-Meg (« Colony Forming Unit Megakaryocyte ») qui, suite au processus de maturation, se différencie en mégakaryocytes, la cellule qui produit les plaquettes sanguines⁴⁷.

2.3.2. Les cellules progénitrices lymphoïdes

Les cellules progénitrices lymphoïdes se différencient en deux classes distinctes: les cellules progénitrices des lymphocytes B et ceux des lymphocytes T. La maturation de cellules progénitrices mène, comme leur nom l'indique, à la formation de lymphocytes B et de lymphocytes T, ainsi que de cellules NK (« Natural Killer »). Les lymphocytes B, T et NK jouent un rôle essentiel dans l'immunité⁴⁷. La fonction principale des lymphocytes T est de contrôler l'immunité cellulaire, ils vont reconnaître et rejeter les tissus étrangers. Les lymphocytes T auraient aussi un rôle important dans la surveillance immunitaire contre le cancer. Les lymphocytes B sécrètent des anticorps en réponse à une stimulation antigénique et sont responsables de l'immunité humorale. Les lymphocytes NK sont capables de détruire les cellules anormales (cellules tumorales, cellules greffées, cellules infectées) par induction d'apoptose ou de cytolysse via une série de molécules activatrices et inhibitrices. Les lymphocytes B se développent au sein de la moelle

osseuse alors que les cellules progénitrices des lymphocytes T « Early Thymic Progenitors » migrent dans le thymus pour se différencier en lymphocytes T mature. Les thymocytes sont sélectionnés positivement par les cellules et négativement en fonction de leur capacité à reconnaître les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et leur faible affinité pour les antigènes du soi. Ensuite, ils circulent dans le sang et la lymphe vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate⁴⁷.

3. Les sources de cellules souches hématopoïétiques

3.1. La moëlle osseuse

La MO contient plusieurs types cellulaires comme les CSH et les cellules progénitrices, les cellules du stroma médullaire, etc. C'est dans cet organe que s'effectue la régulation de l'hématopoïèse⁴⁷. Les cellules médullaires sont aussi utilisées pour réaliser des allogreffes et des autogreffes. Ces interventions impliquent des ponctions au niveau des os plats du bassin afin de prélever un nombre suffisant de cellules de MO nécessaires à la greffe.

3.2. Les cellules du sang périphérique mobilisé

Les CSH se retrouvent dans la MO et le sang périphérique a des quantités plus faible. Pour augmenter le nombre de CSH dans le sang périphérique, on peut « mobiliser » les CSH médullaires et favoriser leur passage au niveau du sang. La mobilisation des CSH est régulée au niveau de la MO via des interactions entre les cellules progénitrices hématopoïétiques et le stroma médullaire⁴⁹. En effet, des études ont démontré que l'administration de facteurs de croissance pouvait augmenter considérablement le nombre de cellules progénitrices hématopoïétiques contenues dans le sang^{50;51}. Les facteurs de croissance les plus utilisés sont le G-CSF (« Granulocyte Colony Stimulating Factor »), le GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor »), et plus récemment le SCF (« Stem Cell

Factor »).⁵² Lorsque le SCF est combiné au G-CSF, ceci permet une potentialisation de l'effet de mobilisation des CSH. Le SCF est le ligand du récepteur c-kit et il a une activité tyrosine kinase retrouvée sur une variété de cellules progénitrices hématopoïétiques immatures, mais il a aussi un effet sur les cellules effectrices plus matures⁵³.

3.3. Le sang de cordon ombilical (SC)

Il a été démontré que le SC contient un nombre élevé de cellules progénitrices immatures ou engagées dans les différentes lignées hématopoïétiques⁵⁴. Par exemple, on retrouve dans le SC un nombre plus élevé de cellules progénitrices progéniteurs CFU-GM et de CFU-GEMM ainsi qu'une vitesse de prolifération plus rapide de ces cellules progénitrices progéniteurs^{55;56} comparativement aux cellules progénitrices normalement retrouvées dans le sang périphérique de sujets adultes. Le SC ombilical offre un avantage important : une grande disponibilité puisque celui-ci n'est habituellement pas conservé après l'accouchement. Malheureusement, chaque cordon ombilical contient un nombre relativement limité de CSH totales, ce qui fait que plusieurs cordons ombilicaux sont nécessaires pour effectuer une greffe de SC chez un patient adulte. De nombreuses études *ex vivo* sont actuellement réalisées afin de tenter de trouver des méthodes efficaces pour favoriser l'expansion des CSH.

4. L'expansion *ex vivo* de cellules souches hématopoïétiques

L'incapacité d'augmenter le nombre des cellules souches hématopoïétiques *ex vivo* constitue une limitation importante à l'utilisation courante de la transplantation de CSH. C'est particulièrement vrai dans les cas du SC où le nombre de CSH disponibles est limité et ne permet généralement pas la greffe chez l'adulte.. Des études ont démontré que l'autorenouvellement des CSH est possible *ex vivo*, mais que la différenciation est favorisée par rapport à l'expansion, ce qui a pour effet d'entraîner une perte nette de CSH⁵⁷⁻⁵⁹.

Plusieurs études ont utilisé des cytokines pour augmenter le nombre de CSH *in vitro* comme l'IL-3^{60;61}, l'IL-6⁶², l'IL-11^{62;63}, et aussi le Flt-3 ligand⁶³, la thrombopoïétine (TPO)⁶⁴ et le SCF⁶³. Ces études ont démontré que les CSH étaient augmentées en nombre, une augmentation de trois fois dans un milieu de culture cellulaire sans sérum avec des concentrations élevées de cytokines⁶⁵. L'optimisation des combinaisons de cytokines ne semble donc pas être suffisante afin d'induire une expansion significative des CSH, ces combinaisons menant presque toujours à une différenciation des CSH. Il semble que les cytokines, utilisées seules ou en combinaison, ont un effet important sur la survie, la prolifération et la maturation des CSH mais ont un effet limité sur l'autorenouvellement des CSH^{66;67}. D'autres études ont démontré que plusieurs voies de signalisation étaient impliquées dans l'expansion des CSH *in vitro* comme par exemple le récepteur de l'acide rétinoïque⁶⁸, Notch 1⁶⁹, Sonic Hedgehog (Shh) via BMP4⁷⁰, Wnt⁷¹, les gènes HOX^{82;83}, etc.

5. Les gènes HOX

Des études récentes ont décrit les gènes de la famille HOX, qui sont des facteurs de transcription, comme des régulateurs hématopoïétiques potentiellement très puissants⁷². Les gènes HOX sont des gènes homéotiques qui sont essentiels à l'établissement de l'axe antéro-postérieur et l'identité segmentaire pendant l'embryogenèse⁷³. Les quatre complexes HOX (A, B, C et D) chez l'homme sont situés sur les chromosomes 2, 7, 12 et 17⁷⁴. Les gènes homéotiques sont des gènes qui ont un domaine protéique, l'homéodomaine. L'homéodomaine comporte un motif de type hélice-boucle-hélice qui est capable de se lier à l'ADN⁷⁵ et ainsi de réguler la transcription de gènes.

5.1. Le rôle des gènes HOX dans l'hématopoïèse

Les cellules hématopoïétiques peuvent exprimer les gènes HOX et cette expression semble être limitée aux cellules plus primitives, telles que les cellules de la MO $CD34^+CD38^-$ chez l'humain⁷². De manière intéressante, ces études ont démontré des effets gène-spécifiques pour les gènes HOX à de multiples niveaux de l'hématopoïèse. Par exemple, la surexpression du gène HOXB3 altère le développement lymphoïde mais favorise le développement myéloïde⁷⁶, alors que la surexpression du gène HOXA10 interfère avec la différenciation des mégacaryocytes, des macrophages, et des lymphocytes B⁷⁷. Donc, les facteurs de transcription HOX sont des régulateurs importants de la prolifération et de la

différenciation des cellules hématopoïétiques primitives. Parmi tous les gènes de la famille HOX, le gène HOXB4 se révèle un régulateur positif de l'autorenouvellement des CSH qui présente un potentiel intéressant dans la génération de CSH *ex vivo*.

6. HOXB4

6.1. La surexpression rétrovirale de HOXB4 augmente le nombre de CSH *in vivo*

Le rôle joué par HOXB4 dans l'hématopoïèse a été investigué initialement par des études de surexpression rétrovirale de HOXB4 dans des cellules de MO⁷⁶⁻⁷⁹. Ces études ont démontré que la surexpression rétrovirale de HOXB4 pouvait augmenter de manière significative la régénération *in vivo* des CSH (augmentation jusqu'à 1000 fois) après la transplantation de cellules de MO dans des souris receveuses primaires et secondaires^{79;80}. La surexpression de HOXB4 augmente spécifiquement l'expansion des CSH sans altérer la différenciation normale des cellules progénitrices hématopoïétiques, même après 60 semaines et ce, sans induire de transformation maligne^{79;81-83}. Il a été démontré que cette expansion est liée aux CSH puisque le même profil d'intégration du virus a été retrouvé dans des cellules myéloïdes et lymphoïdes provenant d'une même souris^{79;80}. Le mécanisme responsable de cet effet serait l'autorenouvellement et ceci a été démontré en utilisant plusieurs receveurs secondaires reconstitués avec des CSH qui démontraient un profil d'intégration virale identique⁸⁰. Ces études ont démontré que la surexpression du facteur de transcription HOXB4 conduit à une expansion sélective des CSH *in vivo*^{80;82} sans induire de leucémie^{82;83}.

Des études de cinétique ont démontré que seulement quatorze jours après la greffe de moelle osseuse, le nombre de CSH qui surexpriment HOXB4 est

augmenté de plus de 20 fois en comparaison aux CSH contrôles (GFP seul). Au cours des dix semaines qui ont suivi la greffe médullaire, le nombre de cellules qui surexpriment HOXB4 avait augmenté de seulement 4 fois, ce qui montre que l'effet de HOXB4 est précoce et survient principalement dans les premières 2 semaines suivant la greffe. L'expansion des cellules contrôles est graduelle et débute plus tard (plateau après 3 mois)⁸². Donc, ces observations suggèrent que la cinétique est très différente dans le cas de HOXB4 comparativement aux cellules contrôles. Le mécanisme impliqué est l'autorenouvellement symétrique (expansion) pour les CSH qui surexpriment HOXB4 face aux CSH contrôles où le mécanisme impliqué est l'autorenouvellement asymétrique (maintien du nombre de CSH initial).

Il est intéressant de noter que l'effet de HOXB4 sur l'expansion des CSH est inversement proportionnel à la dose de cellules transplantées. Si on injecte entre 5 et 50 CSH qui surexpriment HOXB4, une expansion de 20 fois est observée comparativement à une expansion de seulement 5 fois si on injecte 2000 CSH qui surexpriment HOXB4. Dans les deux cas, les CSH qui surexpriment HOXB4, établissent un « pool » de CSH à des niveaux normaux⁸², une capacité que les CSH contrôles, qui ne surexpriment pas HOXB4 ne possèdent pas.

6.2. La surexpression rétrovirale de HOXB4 augmente le nombre de CSH in vitro

L'expansion de CSH qui surexpriment HOXB4 a été également évaluée *in vitro*. Des cellules de MO infectées avec le rétrovirus HOXB4 ou des cellules

contrôles (le vecteur seulement) ont été mises en culture pendant 12 jours et le nombre de CSH dans ces cellules expansées *ex vivo* a été déterminé. Après 6 jours en culture, le nombre de CSH qui surexpriment HOXB4 a augmenté de 5 à 7 fois et atteignait 40 fois après 12 jours de culture. Dans la même culture, le nombre de cellules contrôles a diminué de 7 à 10 fois après 6 jours et de 30-60 fois après 12 jours. Ces résultats suggèrent que la limite à l'expansion qu'on retrouve *in vivo* n'est pas imposée *in vitro* où il est possible d'augmenter beaucoup le nombre de CSH en surexprimant HOXB4⁸².

6.3. HOXB4, une protéine recombinante qui augmente le nombre de CSH in vitro et in vivo

Toutes les études de surexpression rétrovirale de HOXB4 dans des cellules de MO ont démontré une expansion sélective des CSH *in vivo*^{80;82} et *in vitro*⁸³ sans induire de leucémie^{82;83} chez la souris. Ces résultats sont très importants pour des protocoles d'expansion de CSH humaines. Malheureusement, l'utilisation d'un vecteur rétroviral peut présenter des risques chez l'humain. En effet, l'utilisation d'approches génétiques impliquant des vecteurs rétroviraux est associée à un risque non négligeable de transformations tumorales. Ce risque est suffisamment important pour limiter le nombre d'études cliniques utilisant une telle approche. C'est pour cette raison que de nombreux groupes de recherche tentent de raffiner les stratégies génétiques pour cibler des régions « sécuritaires » d'intégration du

rétrovirus dans le génome. Dans le cas de HOXB4, il est possible d'utiliser une alternative sécuritaire pour augmenter le nombre de CSH humaines.

En effet, les études suivantes ont démontré qu'il est possible d'augmenter le nombre de CSH *in vivo* et *in vitro* en utilisant HOXB4 en tant que protéine recombinante. Deux groupes ont analysé deux techniques différentes. Dans le premier cas, HOXB4 a été attaché à un petit peptide TAT provenant du virus HIV, dont le rôle est de permettre l'internalisation de HOXB4⁸⁵. L'autre groupe a utilisé la protéine HOXB4 produite par des cellules nourrices⁸¹. Les résultats obtenus dans des modèles murins sont comparables à ceux obtenus avec de cellules infectées par rétrovirus.

6.4. La protéine recombinante HOXB4 a la capacité d'augmenter le nombre de CSH humaines in vitro

Chez l'humain, plusieurs études ont démontré qu'il est possible d'augmenter le nombre de CSH quand on utilise HOXB4 et des cellules de sang de cordon ombilical grâce à des progrès réalisés avec des lentivirus et des adénovirus. Buske *et al.*⁸⁶ ont observé une augmentation de 5 fois des LTC-IC (« long term culture initiating cells ») après 7 jours en culture, une augmentation de 30 fois des précurseurs B (CD34⁺CD19⁺), et une expansion de 4 fois des « NOD-SCID repopulating cells » (SRC), qui sont des cellules très primitives, capables de reconstituer à long terme un système hématopoïétique humain chez la souris NOD-SCID.

Schiedlmeier *et al.*⁸⁷ ont démontré que chez l'humain, la surexpression de HOXB4 dans les cellules de sang cordon CD34⁺ conduisait à une augmentation de 8 fois des cellules CD34⁺ transplantées de dans une souris receveuse NOD-SCID, mais la différenciation lymphoïde et myéloïde était compromise. Brun *et al.*⁸⁸ ont utilisé un adénovirus pour surexprimer HOXB4 dans des cellules de sang cordon CD34⁺ et ils n'ont pas observé d'augmentation de nombre de cellules progénitrices plus primitives ou de la fréquence de colonies CFC « colony forming cells ». Finalement, Amsellem *et al.* (2003)⁸¹ ont démontré une augmentation de 4 fois pour les LTC-IC après 5 semaines et une augmentation de 2 fois en SRC.

Tous ces résultats démontrent que la surexpression de HOXB4 dans les CSH conduit à une augmentation du nombre de cellules souches primitives qui correspondent aux CSH. Malheureusement, plusieurs informations concernant l'activité de HOXB4 sur les cellules hématopoïétiques humaines demeurent inconnues et sont nécessaires pour d'éventuelles études cliniques. Néanmoins, les études précédentes ont démontré que la surexpression du facteur de transcription HOXB4 conduisait à une expansion sélective des CSH humaines¹¹⁰. Il reste maintenant à définir les conditions qui permettront son utilisation dans des études cliniques.

6.5. HOXB4 n'est pas essentiel pour l'hématopoïèse définitive

Des études effectuées chez la souris ont démontré que l'ablation du gène HOXB4 par une approche Cre/loxP conduisait à une diminution significative du le

nombre de cellules de la rate, de la MO. Le nombre de cellules progénitrices primitives et de CSH est aussi réduit dans la MO et le foie, mais la distribution des lignées hématopoïétiques demeure normale. La technique Cre/loxP permet d'inactiver spécifiquement un gène pour étudier sa fonction dans un tissu ou un type cellulaire particulier. Chez la souris double mutante HOXB3/B4^{-/-}, les différences qualitatives au niveau des cellules progénitrices sont similaires alors que les différences quantitatives sont plus prononcées comparativement aux souris HOXB4^{-/-} seulement⁸⁹. Ces résultats démontrent que HOXB3 et HOXB4 seraient requis, mais pas essentiels pour la fonction normale des CSH. De même, une autre étude a démontré que si on enlève tout le regroupement HOXB comprenant les gènes de HOXB1 à HOXB9 (HOXB1-HOXB9^{-/-}), l'hématopoïèse définitive n'est pas affectée. Alors que les gènes HOXA sont régulés à la baisse, les trois gènes HOXC dont HOXC4 sont plutôt régulés à la hausse⁹⁰. Si le gène HOXB4 est déficient, l'expression des autres gènes HOX (HOXA4, HOXA9, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXC4 et HOXD4) et des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (c-myc, p21, Jun-B, cyclinD1, c-Jun, et CXCR4) sont modifiées¹¹³. Ces études mettent en évidence des mécanismes compensatoires et des systèmes de redondance qui existent entre les gènes HOX.

6.6. Les cofacteurs de HOXB4 et leurs rôles dans l'hématopoïèse

Certaines études *in vitro* ont démontré que les protéines HOX collaborent avec les membres de la famille TALE (three-amino-acid loop extension) qui augmentent

l'affinité des protéines HOX pour l'ADN. La famille TALE contient les protéines PBC (PBX dans le cas des mammifères) et MEIS (MEIS et PREP1 dans le cas des mammifères)⁹¹. Les groupes 1 à 10 des protéines HOX vont interagir avec PBX alors que les protéines HOX de 9 à 13 vont plutôt interagir avec MEIS⁹².

En plus d'augmenter l'affinité des facteurs de transcription HOX pour l'ADN, les protéines PBX et MEIS sont impliquées rôles dans le développement embryonnaire^{93;94}. En accord avec ces fonctions, certaines études ont démontré que les souris mutantes pour *Pbx1* et *Meis1* meurent en phase embryonnaire et présentent les mêmes caractéristiques concernant les CSH que les souris *HOX-/-*, ce qui suggère une implication de ces gènes dans l'auto-renouvellement et la prolifération des CSH.

Les résultats des études *in vivo* ont démontré que les CSH qui surexpriment *HOXB4* et présentent des niveaux bas de la protéine *Pbx1* (CSH-*HOXB4hi/PBX1lo*) sont plus compétitives par rapport aux CSH-*HOXB4hi* seulement (une augmentation de 10-100 fois)^{109;120}. Ces résultats suggèrent que l'expansion des CSH qui surexpriment *HOXB4* avec des niveaux bas de *PBX1* est plus rapide que l'expansion des CSH qui surexpriment seulement *HOXB4*. Une des hypothèses serait que ces cellules vont remplir et occuper la niche avant les CSH qui surexpriment seulement *HOXB4*. Ces études ont identifié *HOXB4* comme un outil important pour trouver les facteurs extrinsèques qui régulent le nombre de CSH *in vivo*^{109;120}.

Il semble que les membres de familles PBX et MEIS sont aussi impliqués dans les leucémies humaines et murines. En effet, *PBX1* fait partie des protéines de

fusion E2A-PBX1 qui est retrouvé dans 10-20% des cas de leucémies pré-B pédiatriques^{95;96}. D'autres études ont aussi démontré une induction de leucémies myéloïdes aigues (LMA) dans le cas de co-surexpression rétrovirale de HOXA9 et E2A-PBX1⁹⁷. MEIS1 est impliqué dans des leucémies myéloïdes chez les souris BXH-2 et il interagit avec HOXA7 et HOXA9 dans les leucémies myéloïdes aigues^{78;98;99}. Ces derniers exemples soulignent l'importance d'évaluer l'implication potentielle de HOXB4 dans la leucémogénèse, dans un contexte n'impliquant pas de thérapie génétique.

7. La leucémie et le rôle des gènes HOX dans la leucémie

La principale caractéristique de la leucémie est la prolifération anormale et excessive de précurseurs des leucocytes qui sont bloqués dans un stade de différenciation précoce¹⁵.

Chez l'homme et la souris, l'expression anormale des gènes HOX est associée à la transformation leucémique. Des études ont démontré que les gènes HOX sont impliqués dans les leucémies myéloïdes et lymphoïdes. Les gènes HOX impliqués dans la transformation leucémique chez les souris sont : HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXB3, HOXB6 et HOXB8 (études sur la MO infectée avec des rétrovirus qui surexpriment les gènes HOX)^{76-78;100}.

HOXA9 semble être plus fréquemment associé à la leucémie myéloïde aiguë (LMA) chez l'humain et constitue un mauvais pronostic pour ce type de leucémie¹⁰¹. Une translocation qui survient entre HOXA9 et les gènes NUP-98 a comme conséquence d'augmenter l'expression de l'oncoprotéine de fusion NUP98-HOXA9 qui est également impliquée dans un sous-ensemble de leucémies myéloïdes humaines soit des LMA primaires, des LMA secondaires (survenant suite à une chimiothérapie) et des leucémies myéloïdes chroniques^{102;103}. Chez la souris, la transplantation des cellules de MO qui surexpriment la translocation NUP98-HOXA9 et NUP98-HOXD13 a permis de démontrer l'implication directe des gènes HOXA9 et D13 dans la leucémie^{78;104}.

Les gènes HOXA sont aussi impliqués dans les leucémies lymphoïdes¹⁰⁵. Tout le groupe de gènes A est normalement dérégulé dans les leucémies lymphocytaires T

aiguës qui expriment le réarrangement TCR β -HOXA^{106,107}. Les gènes HOX sont aussi dérégulés dans les leucémies lymphoblastiques aiguës B et T où la fusion MLL est impliquée¹⁰⁹⁻¹¹². De plus, HOXA9 et Meis1 sont surexprimés dans les leucémies présentant un réarrangement du gène MLL¹¹²⁻¹¹⁵. Chez les souris transplantées avec des cellules de MO qui surexpriment MLL-ENL, il semble que les gènes HOX sont essentiels au maintien des cellules progénitrices myéloïdes¹¹⁶⁻¹¹⁸ et que le gène HOXA9 serait nécessaire pour induire la leucémie en présence du réarrangement MLL-ENL¹¹⁶.

Toutes ces études démontrent qu'il y a une régulation différente de l'expression des gènes HOX dans les cas de leucémie où le gène de fusion MLL est impliqué. D'autres études ont démontré une collaboration entre le proto-oncogène Meis1 et les gènes HOX, ou les gènes de fusion NUP98-HOX accélèrent la progression leucémique dans des modèles murins (le cas classique étant la collaboration entre HOXA9 et Meis1 dans la LMA)^{78;100;119-122}.

8. Les gènes HOX et les cellules souches leucémiques

Depuis quelques années, le concept de cellule souche leucémique (CSL) est de plus en plus utilisé et accepté. Des études démontrent que les CSL ont des caractéristiques et propriétés similaires à celles des CSH, ce qui signifie que ce sont des cellules multipotentes capables de se différencier, de proliférer et de s'autorenouveler¹²³⁻¹²⁶. Il existe aussi une hiérarchie¹²⁴, avec un nombre très limité de cellules souches leucémiques qui vont donner naissance aux cellules progénitrices plus matures et, ensemble, ces cellules malignes maintiendront la maladie. Une des hypothèses serait que les CSL proviendraient des CSH et ceci surviendrait suite à une mutation quelconque qui par exemple augmenterait la capacité d'autorenouvellement. . Une autre hypothèse serait que les CSL proviendrait de cellules progénitrices qui sont déjà engagés dans la différenciation, mais qui possède encore la capacité de s'autorenouveler, de proliférer ou d'inhiber l'apoptose⁷⁴.

La principale raison permettant de supposer que les gènes HOX sont impliqués dans la leucémogénèse découle de la capacité de ces gènes à réguler l'autorenouvellement des CSH. Des études récentes ont démontré que certains gènes HOX, comme HOXA9, étaient nécessaires mais insuffisants pour induire l'autorenouvellement des CSLs qui génèrent la leucémie. Il est important de noter que HOXB4 n'est pas impliqué de façon directe dans la leucémogénèse humaine.

Des études futures sont nécessaires pour comprendre le mécanisme par lequel les gènes HOX sont capables d'initier et de maintenir le processus

d'autorenouvellement des cellules souches normales et de leur progénie et comment ces gènes pourraient influencer les fonctions des CSL.

9. Description du projet de maîtrise

9.1. Mise en contexte

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer l'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes. Les études précédentes ont démontré que la surexpression du facteur de transcription HOXB4 conduisait à une expansion sélective des CSH *in vitro*⁸³ et *in vivo*^{104;106} sans induire de leucémie^{106;107} et des effets similaires avaient été observés avec des cellules humaines¹¹⁰. De plus, l'expansion des CSH murines survient en présence de la protéine soluble recombinante TAT-HOXB4⁸⁵ et des effets semblables ont été obtenus avec des cellules humaines placées en co-culture avec des cellules stromales qui produisent HOXB4⁸¹.

La demi-vie de la protéine HOXB4 est cependant relativement courte, c'est-à-dire une heure à l'intérieur de la cellule et quatre heures dans le milieu de culture. Ceci représente un obstacle majeur pour l'utilisation clinique de HOXB4. Pour augmenter la demi-vie de la protéine HOXB4, trois mutants ont été créés en causant des substitutions ponctuelles d'acides aminés. Ces mutations ont été réalisées parmi les 31 premiers acides aminés (Leu7 (1423) -> Ala, Tyr23 (1426) -> Ala et Tyr28 (1427) -> Ala) dans des sites potentiellement impliqués dans la dégradation de HOXB4. Chacun des 3 mutants de HOXB4 ayant la mutation ponctuelle mentionnée a démontré une meilleure stabilité de la protéine (Beslu N et Sauvageau G, communication personnelle). De plus, chez la souris, des transplantations de cellules souches surexprimant les mutants de HOXB4 ont

démontré que ces 3 mutants permettaient d'induire une expansion sélective des CSH *in vivo* semblable à celle causée par le gène HOXB4 sauvage.

Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que des souris modifiées génétiquement pour surexprimer HOXB4 natif, avaient une augmentation de la proportion de cellules myéloïdes retrouvées dans le sang à 14 semaines post-greffe (47,9% vs 17,3% pour les souris normales). Au contraire, la surexpression de HOXB4 mutant dans les CSH, sous chacune de ses 3 formes, permet de rétablir l'équilibre entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes dans le sang périphérique et les proportions se comparent aux valeurs normales retrouvées chez la souris (Beauchemin S., travail non publié)²¹.

9.2. L'hypothèse et les objectifs de ce projet

Le présent projet vise à élucider les mécanismes impliqués dans l'expansion des cellules myéloïdes suite à la surexpression de la protéine HOXB4 sauvage. Notre hypothèse est que les cellules progénitrices myéloïdes exprimant HOXB4 sauvage (s-HOXB4) prolifèrent plus rapidement que les cellules contrôles ou que les cellules exprimant les formes mutantes de HOXB4 (m-HOXB4). Alternativement, une seule CSH exprimant HOXB4 sauvage pourrait générer plus de cellules progénitrices myéloïdes que les cellules contrôles ou exprimant les mutants.

Pour ce projet nous avons établi les objectifs suivants :

- Comparer la capacité de prolifération des cellules progénitrices myéloïdes exprimant la protéine HOXB4 sauvage à celle des cellules contrôles ou cellules qui expriment les différentes formes mutantes de la protéine HOXB4.
- Déterminer l'effet de la protéine HOXB4 sauvage et des différentes protéines mutantes HOXB4 sur la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes.

9.3. Procédure expérimentale et résultats

Pour ce projet, la capacité de prolifération des cellules progénitrices myéloïdes exprimant s-HOXB4 a été comparée avec celle des cellules contrôles ou des cellules exprimant les m-HOXB4.

Les essais clonogéniques ont démontré que s-HOXB4 et m-HOXB4 augmentaient significativement le nombre total de cellules progénitrices myéloïdes comparativement aux contrôles ($p < 0.001$) et qu'ils augmentaient aussi la proportion des colonies myéloïdes ($p < 0.001$). En présence de s-HOXB4, les colonies CFU-GM plus primitives sont moins nombreuses, mais leur taille est plus grosse que les colonies m-HOXB4 ($p < 0.001$). Nos résultats démontrent aussi que les colonies GM plus primitives s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 produisent plus de cellules myéloïdes matures comparativement aux cellules contrôles ou aux deux autres mutants de la protéine HOXB4 (1426 et 1427). Par ailleurs, s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 préservent un plus grand nombre de cellules progénitrices immatures

par rapport aux contrôles et aux autres mutants de HOXB4 après un réensemencement de colonies GEMM ($p < 0.01$). Aussi, s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 génèrent une plus grande proportion de GEMM survivant à long terme lors d'expansions successives en culture liquide. Ces résultats suggèrent donc que le mutant 1423 présente un profil intéressant pour une utilisation en clinique puisqu'il préserve les cellules progénitrices immatures à long terme comme s-HOXB4 mais qu'il rétablit l'équilibre entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes dans le sang.

ARTICLE

Impact of HOXB4 on the expansion and differentiation of myeloid progenitors

*Irina Cristina Helici¹, Stéphanie Beauchemin¹, Gorazd Krosl¹, Guy Sauvageau^{1, 2},
Janos G. Filep¹ and Denis Claude Roy¹*

¹Hopital Maisonneuve –Rosemont Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ²IRIC , University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Key words: wild type and mutated HOXB4, hematopoietic stem cells, myeloid progenitors, GEMM.

Contributions of the authors

Irina Cristina Helici: I did all the laboratory work for all the experiences mentioned in this article. I also have a major contribution in writing the article and the theses.

Stéphanie Beauchemin: She helped me in the beginning with the laboratory work (protocols, manipulation techniques). I continued her project, so I referred in this these to some of her unpublished results.

Dr. Gorazd Krosi: He is my laboratory supervisor. He helped me a lot in writing the article. He offered a great intellectual and scientific support all along my master.

Dr. Guy Sauvageau: His laboratory provided me the wt –HOXB4 and mutant-HOXB4 vectors and also the protocols that I needed. So, he offered a great laboratory and scientific support which helped me a lot to obtain these results.

Dr. Janos G. Filep and Dr. Denis Claude Roy: My co-director and my director their intellectual and scientific support was very helpful during my master studies and also for this thesis.

Abstract

Over-expression of the homeobox transcription factor HOXB4 results in a selective expansion of HSC *in vitro* and *in vivo*. However, the intracellular half-life of the protein is only one hour, which represents an important obstacle for its clinical use. Three HOXB4 mutants with single amino acid (AA) substitution in the first 31 AA have demonstrated increased intracellular stability of the protein. We evaluated the effect of wild type (wt) and mutant (m) HOXB4 on expansion and differentiation of myeloid progenitors. Ectopic expressions of wild type (wt) and mutant (m) HOXB4 had a comparable effect on frequency of myeloid progenitors in semi-solid assay. However, the proliferative capacity of myeloid progenitors expressing wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 was considerably better than that of control (GFP only) and other two mutants. Additionally, while all HOXB4 variants conferred similar self-renewal capacity to multipotent (GEMM) progenitors, the production of single-lineage granulocytic progenitors (CFU-G) was severely compromised when cells were expressing 1426 and 1427 m-HOXB4. Conversely, the cellularity of myeloid colonies was also diminished with these mutants suggesting, that both mutations affect certain biologic function(s) of wt-HOX4 in addition to increasing its stability. On the other hand, 1423 m-HOXB4 did not seem to lose any wt-HOXB4 functions tested in *in vitro* assays making this mutant an interesting target for further investigation.

Key words: wild type and mutated HOXB4, myeloid progenitors.

Introduction

Hematopoiesis in humans (and other mammals) is executed primarily within bone marrow, a complex multicellular system, which is designed to sustain an intensive production of mature blood cells throughout the life. All hematopoietic cells are produced from a small number of hematopoietic stem cells (HSC), whose pool size is maintained in delicate equilibrium between self-renewal and differentiation. Although HSC are mostly dormant, their self-renewal/expansion capacity can be reversibly released in emergency situations¹, such as during the early stage following HSC transplantation^{2,3}. The ability of HOXB4 to shift the balance of HSC cell divisions in favour of self-renewal has been extensively reported³⁻⁸. This feature has sparked intensive research into the possibility of using HOXB4 as an HSC expansion agent for clinical purposes. While other molecules, such as soluble Jagged-1, Sonic Hedgehog and Wnt have also been identified as potential HSC expansion inducers⁹⁻¹⁵, the HOXB4 has to date shown most consistent and powerful HSC expansion capabilities. Its usefulness for the clinical utilization has been further enhanced by discovery, that despite being a transcription factor, it can be utilized as a soluble protein added to the cell culture^{16,17}. We have additionally shown that 8 day co-culture of human mobilized peripheral blood cells with HOXB4 results in a net expansion of NOD-SCID repopulating cells (SRC), considered to reflect human HSC, by 8 fold^{18,19}. However, the major obstacle to HOXB4 clinical usage is its extremely short intracellular and extracellular half-life (70 minutes and 4 hours, respectively)¹⁷ and the need for repeated, every 4 hours,

additions to achieve maximum expansion¹⁸. Beslu et al.²⁰ have identified 31 N-terminal amino-acids (AA) region, highly conserved between paralogs and during evolution that appear to be responsible for HOXB4 ubiquitine-dependant degradation. They have shown that deletion of this region (Δ 31 HOXB4) results in 3-fold more stable protein. Mouse HSC engineered to express Δ 31 HOXB4 appeared to be as competent as those expressing wt HOXB4 in reconstituting robust hematopoiesis in lethally irradiated recipients. However, *in vitro* experiments have also shown that Δ 31 HOXB4 expressing progenitors may have somewhat impaired myeloid proliferation capacity in comparison to wt-HOXB4. To further elucidate HOXB4 degradation pathway and potentially dissociate degradation from other biological activities, Beslu et al. have generated 4 different HOXB4 point mutants, which have intracellular stability similar to that of Δ 31 HOXB4²⁰. These mutants have been tested for biological activity by Beauchemin S. et al.²¹ who have shown that the mouse HSC overexpressing HOXB4 mutants are at least as competent as those expressing wt HOXB4 to reconstitute irradiated recipients. Moreover, mice reconstituted with HSC expressing mutant HOXB4 have shown more balanced lympho-myeloid reconstitution compared to those reconstituted with wt HOXB4 expressing HSC despite very high HOXB4 protein levels²¹. This discovery was interesting, since several authors have reported a correlation between HOXB4 levels and differentiation²²⁻²⁴.

To examine potential reasons explaining differences in myeloid proportions according to the nature of HOXB4 exposure, we have investigated the effect of mutant HOXB4 expression on myeloid expansion *in vitro*. In this article we show

that forced expression of 2 HOXB4 mutants results in decreased myeloid output from granulocyte-macrophage (GM) progenitors and also decreased production of granulocyte (G) progenitors. These results also indicate that a specific region within first 31 AA is not only responsible for overall HOXB4 protein stability but also plays a role in other biological functions of the molecule.

Materials and Methods

Mice

Male and female C57BL/6J mice X-Y weeks of age were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). B6SJL mice were bred under specific pathogen-free conditions in the Hopital Maisonneuve-Rosemont (HMR) Research Center animal facility. The *in vivo* experimental protocols were approved by HMR Research Center Animal Health Care Committee.

Bone marrow isolation

Mice were sacrificed 4 days after intravenous injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil (5-FU). Bone marrow was isolated from both femurs and tibias by flushing with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-GIBCO; Grand Island, NY, USA) supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA). Next, the cells were spun down at 800 g for 10 minutes at 4°C and washed with DMEM supplemented with 2% FBS.

Retroviral infection

Generation of MSCV-IRES-GFP and MSCV-HOXB4-IRES-GFP vectors and the GPE- based producers cells were described previously¹⁴. Generation of ecotropic retroviruses producing GP+E-86 cells was described before⁴. BM cells were resuspended in bone marrow media comprising: DMEM with 15% FBS, 6 ng/mL IL-3, 10 ng/mL IL-6, 100 ng/mL Stem Cell Factor (SCF), 10 µg/mL ciprofloxacin (all kindly provided by Dr. Sauvageau, IRIC, Montreal, Québec, Canada) and 50 µg/mL gentamycin (Gentamicin Reagent Solution, GIBCO) and incubated in suspension culture dishes (Starstedt, Newton, NC, USA) for 48 hours. The media was changed once after 24 hours and cells resuspended at the same concentration. Then cells were plated after centrifugation at 600 g (10 minutes, 4°C) and resuspended in bone marrow media, additionally supplemented with 6 µg/mL hexadimethrine bromide (polybrene, Sigma, St. Louis, Missouri) at a concentration of 1×10^6 BM cells/mL. The resulting cell suspension was then overlayed over a confluent monolayer of irradiated (1500 cGy) GP+E/86 cells. The BM cells were cocultured for 48 hours and then recovered by repeated washing of GP+E/86 cells monolayer with DMEM supplemented with 2% FBS.

Colony forming cell assay

Sorted GFP positive cells (purity between 98% and 99% **using FACS**) were plated in 35-mm non-adherent culture dishes (Sarstedt) (10^3 cells per dish) in 1,1 mL of methocult containing DMEM (GIBCO), 15% FBS tested for semi-solid assays, 35% deionized BSA, 2mM Glutamine (L-Glutamine; Invitrogen, Carlsbad,

California, USA), 200 µg/mL holo-Transferin (Sigma), 1×10^{-4} M β -mercaptoethanol (American Chemicals LTD.), IL-3 10 ng/mL, IL-6 10 ng/ml, SCF 50 ng/mL, EPO 5U/mL. All semi-solid cultures were initiated in duplicates, incubated at 37°C in a fully humidified environment with 5% CO₂ and were then scored after 9-10 days.

Colony size quantification

Micrographs were obtained with LEICA microscope (Wetzlar, Germany) at magnification 4 x 0.10 and a Canon digital camera. The quantification of cells per colony was performed using a CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Replating GEMMs assay.

GEMM colonies were aspirated from methyl cellulose, washed twice and then replated in methylcellulose. Cultures were incubated as described above and scored after 9-10 days of incubation.

Long-term expansion of GEMMs

GEMM colonies were aspirated as described above and replated clonally into 96 well plates (Starstedt). The initial number of replated colonies was considered to be 100% plating efficiency for each group. Next, when each culture reached confluence, cells were transferred into a larger container and allowed to expand further. The expansions were: 96 well into 24 well plate (Sarstedt) into 6 well plate

(Starstedt), then 6 cm followed by 10 cm non-adherent cell dishes (Sarstedt). The number of successful transfers and time to confluency were recorded for each colony.

Statistical analysis: Data are expressed as the mean \pm SEM where applicable. Differences between groups were evaluated using ANOVA tests with Bonferroni as a post test which accounted for the multiple comparisons, as well as for the fact that comparisons were interrelated²⁶.

Results

Overexpression of wt- and m-HOXB4 results in increased frequency of myeloid clonogenic progenitors

We have previously documented that transplantation of HSC over-expressing HOXB4 resulted in an increased proportion of myeloid cells in the peripheral blood of transplanted mice. However, transplantation of HSC over-expressing m-HOXB4 restored the lymphoid/myeloid balance to normal values. First, we wanted to determine whether over-expression of wt- and m-HOXB4 altered the frequency of clonogenic progenitors *in vitro*. Bone marrow cells obtained from 5-FU treated mice were transduced with wt- and m-HOXB4 retroviruses and frequencies of the different progenitors assayed in a semi-solid assay. Cells transduced with an empty vector (expressing GFP only) served as controls. All HOXB4 variants significantly

increased the frequency of clonogenic progenitors compared to GFP controls (Figure 1A). However, the frequency of clonogenic progenitors did not differ between wt-HOXB4 and different m-HOXB4 over-expressing samples. Differential analysis of colonies additionally revealed that the observed difference in CFC frequency between HOXB4 groups and GFP group was mainly due to a significant increase in the frequency of myeloid clonogenic progenitors (Figure 1B and 1C). The greatest difference was observed with bi-potent (CFU-GM) and single lineage progenitor CFU-G ($p < 0.001$, Figures 1B and 1C). With bi-potent and CFU-G progenitors there was also significant difference in progenitor frequency between individual HOXB4 groups, where CFU-G and CFU-GMs (less primitive GM progenitors) were significantly increased with 1426 mutant compared to all other groups. Taken together these results indicate that overexpression of HOXB4 first increases the frequency of myeloid progenitors and secondly, a single point (1426) mutation in HOXB4 molecule provides even more advantage to bi-potent myeloid progenitors over their wild type counterparts.

Overexpression of HOXB4 provides growth advantage for myeloid progenitors

While analyzing semi-solid media assays described in the previous section, we have observed consistently larger myeloid colonies arising from wt-HOXB4 expressing progenitors. Representative photographs of CFU-GM for all experimental groups are presented in Figure 2. GM colonies arising from wt-HOXB4 (outlined pictograms) consistently appeared larger compared to colonies arising from all

other groups. Quantification of these differences revealed that not only did colonies arising from wt-HOXB4 expressing CFU-GM contained on average 7 times more cells compared to those in the GFP group (Figure 3, $p < 0.001$), but that overexpression of 1423 m-HOXB4 also resulted in colonies of similar size. On the other hand, overexpression of 1426 and 1427 m-HOXB4 resulted in significantly smaller colonies compared to either wt- or 1423 m-HOXB4 (Figure 3, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ for 1426 and 1427 m-HOXB4, respectively). While colony cellularity for 1426 group was not significantly different compared to that of GFP group, expression of 1427 mutant did result in significantly larger CFU-GM output ($p < 0.01$).

HOXB4 induces increased frequency of secondary colonies

Since increased self-renewal is one of the main effects of HOXB4 on hematopoietic cells, we next investigated if overexpression of HOXB4 and/or its mutants would increase the frequency of secondary colonies upon replating of GEMM colonies. If HOXB4 increases the self-renewal of original progenitors, we would expect an increased number of secondary CFU-GEMM upon replating. Indeed, while no secondary CFU-GEMMs were detected with colony assays initiated from GFP-only group, each replated GEMM colony from HOXB4 groups produced several secondary multipotent colonies (Figure 4A). No significant differences were detected between different HOXB4 groups. In addition, there was a significant increase in progenitors per GEMM colony detected in all HOXB4 overexpressing groups, this increase was more than 4 fold for HOXB4 and 1423 mutant (Figure 4B,

$p < 0.001$) and more than 3 fold for 1426 and 1427 mutant ($p < 0.001$). We also observed that there were significant differences between number of secondary colonies with wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 compared to 1426 and 1427 mutants (Figure 4B, $p < 0.001$). Taken together, these results indicate that all HOXB4 variants induce self-renewal at least on multipotent progenitor level and that this effect may in part be responsible for the increased myeloid output with HOXB4 expressing bone marrow *in vitro*.

Differential analysis of secondary colonies revealed that similar to the results obtained with plating of infected bone marrow cells (Figures 1B and 1C), the observed difference in the number of progenitors per GEMM colony derives from myeloid lineage (Figures 5A and 5B). The most striking difference was observed in the number of colonies deriving from single-lineage CFU-G (Figure 5A) and bi-lineage (large) CFU-GMs (deriving from more mature GM progenitors) (Figure 5B), where wt- HOXB4 and 1423 mutant resulted in 5-6 fold greater number of colonies compared to GFP ($p < 0.001$). The difference was less pronounced within less mature GM progenitors, producing bigger GM colonies (CFU-GMb), wherein only overexpression of wt-HOXB4 resulted in significant increase of the colony number ($p < 0.05$). In the analysis of plating of primary bone marrow culture, there were also differences between groups expressing different HOXB4 mutants. In contrast to results presented in Figures 1B and 1C, replating of GEMM colonies expressing 1423 m-HOXB4 resulted in the greatest output of granulocytic colonies, producing significantly greater number of CFU-G (Figure 5A, $p < 0.001$ and $p < 0.05$ compared to 1426 and 1427 m- HOXB4, respectively). Similar difference was

also observed between 1423 and 1427 m-HOXB4 ($p < 0.05$, Figure 5B). On the other hand, overexpression of wt-HOXB4 induced a greater number of more primitive CFU-GM progenitors (denoted as CFU-GMb) compared to 1426 m-HOXB4 ($p < 0.05$, Figure 5B). Taken together these data indicate that all tested variants of HOXB4 induced significantly elevated myeloid output from replated progenitors present in primary CFU-GEMM.

Overexpression of wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 results in increased cellularity of myeloid colonies

Since one of the explanations for the results described above could be increased proliferation capacity of replated progenitors when overexpressing HOXB4, we evaluated the cellularity of single colonies using a counting methodology described in Materials and methods. Similar to the results obtained with primary colonies, overexpression of wt or 1423 (Figure 6) resulted in significantly increased cell numbers within single GM colonies compared to control (GFP only, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ for wt- HOXB4 and 1423 m-HOXB4, respectively). Additionally, 1423 m-HOXB4 induced significantly larger colonies compared to both other mutants (1426 and 1427, $p < 0.001$) and wt-HOXB4 induced larger colonies compared to 1427 mutant ($p < 0.05$). These data, together with those presented in Figure 3, suggest that the effect of HOXB4 and 1423 mutant on myeloid lineage is persistent and permits enhanced expansion of myeloid cells over a number of cell divisions.

wt HOXB4 and 1423 mutant HOXB4 confer enhanced survival and shorter expansion time to multipotent progenitors and their progeny *in vitro*

To confirm that expression of wt-HOXB4 and its 1423 mutant counterpart enhance the expansion potential of myeloid lineage derived from multipotent (GEMM) progenitors, we clonally replated day 7 GEMM colonies in liquid culture starting with 1 colony per well of 96 well plate and subsequently replated resulting cultures into bigger containers when confluent. We evaluated the proportion of surviving cultures and the time to confluency for wt-HOXB4 and m-HOXB4 expressing cultures and control, GFP expressing cells. The results presented in Figure 7A show that control and 1426 m-HOXB4 expressing cultures tolerated only 2 passages, until cells stopped to expand and died. Similarly, with 1427 expressing cultures, only 5% of replated colonies survived more than 2 passages and none reached the fourth expansion cycle. On the other hand, wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 GEMM derived cultures were significantly more successful, with 37 % of replated colonies progeny reaching fourth passage ($p < 0.01$ for HOXB4 and 1423 mutant *vs* GFP; $p < 0.05$ for HOXB4 and 1423 mutant *vs* 1426 mutant).

In addition both, wt-HOXB4 and 1423 mutant expanded significantly faster in their 2nd and 3rd expansion cycle compared to the only other surviving culture, 1427 m-HOXB4 expressing cells. ($p < 0.05$). Taken together, these results suggest that 1423 mutant and wt-HOXB4 confer similar expansion and also self-renewal capacity to primitive myeloid progenitors, which in turn driven enhanced survival and faster growth of cultures initiated with GEMM colonies overexpressing those two genes.

Discussion

In this study we show that wt-HOXB4 and also 1423 mutant induce significantly greater expansion of myeloid lineage compared to 1426 and 1427 HOXB4 molecules, as well as control cells. This expansion does not seem to be proliferation or cell death dependent since we did not observe significant differences in cell cycling or cell death between the cultures (data not shown). The final output of primitive progenitors and/or HSC is governed by a complex interplay of intrinsic and extrinsic signals (represented by transcription factors, growth factors, cell cycle regulators and adhesion molecules)²⁷⁻²⁹. Homeobox transcription factors have been recognized as important regulators throughout hematopoietic hierarchy^{3,8,16,17,30-32}. The effect of the ectopic expression of HOXB4 on HSCs expansion has been extensively reported³⁻⁸. More recent studies however have also shown that HOXB4 protein regulation may be important for cell fate²²⁻²⁴. It is now known, that the deletion of 31 AA does not impair HSC expansion ability and that it dramatically increases its intracellular half-life²⁰. However, it was also shown that Δ 31HOXB4 overexpressing cells expanded less *in vitro* compared to wtHOXB4-infected cells. In addition, while Δ 31HOXB4 HSCs were as competitive in the repopulation of irradiated recipients, there was *in vivo* selection for clones expressing low levels of Δ 31HOXB4 protein, which resulted in lower number of HSC clones responsible for host repopulation. Since total deletion of the 31AA N-terminal domain may affect biological properties of HOXB4 other than stability alone, we tested 3 mutant HOXB4 proteins where the residues contributing to destabilization of the protein

were exchanged for alanine²⁰. These mutants were shown to be at least as potent in myelo-lymphoid repopulation of irradiated recipients as wt-HOXB4²¹. In addition, mice repopulated with HSCs expressing m-HOXB4 presented a more balanced myelo/lymphoid ratios than those reconstituted with wt-HOXB4 expressing HSC. The effect of high level HOXB4 on hematopoietic differentiation *in vitro* and *in vivo* has already been reported previously^{22,23}. Our analysis of m-HOXB4 effect on hematopoietic progenitors *in vitro* has shown that all of the mutants expand progenitors similarly to wt-HOXB4 with the exception of 1427 m-HOXB4 that induced less expansion than the native form of HOXB4, but still induced greater expansion compared to GFP control (Figure 1). This was in contrast with results obtained by Beslu et al.²⁰, which showed that $\Delta 31$ HOXB4 overexpression induced an *in vitro* decrease of myeloid progenitors. On the contrary, differential analysis of myeloid progenitors showed that most of the myeloid progenitors frequencies were enhanced in the presence of all HOXB4 mutants compared to control, and at least equal to those obtained with wt-HOXB4 (Figure 2B and 2C). This indicates that the increased lifetime of mutant HOXB4 (similar to that of $\Delta 31$ HOXB4²⁰) does not impair the development and differentiation of myeloid lineages. However, we have found that there was a significant difference between the myeloid colony sizes depending on the expressed HOXB4 mutant type (Figure 4). While all HOXB4 mutants (with exception of 1426) induced larger colonies compared to those arising from GFP only expressing cells, there was a notable difference between colony cellularity comparing wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 expressing cultures with 1426 and 1427 m-HOXB4 expressing cells. The lower cell numbers in myeloid

colonies arising from 1426 and 1427 m-HOXB4 expressing progenitors may be one of the reasons for the less pronounced shift to myeloid reconstitution in mice transplanted with those mutants²¹. It is also interesting that similar *in vitro* decrease in myeloid repopulation was seen with $\Delta 31$ HOXB4²⁰. Since the intracellular HOXB4 protein level in cells expressing 1423 m-HOXB4 is similar to that observed in cells expressing 1426 m-HOXB4²¹, extended half-life and protein accumulation can not be the only reason for the observed differences in the ability of myeloid progenitors to generate mature cells. In this regard it is also interesting to note that both 1426 and 1427 mutations are Y->A replacements, which may have affected other biological functions in addition to impairing intracellular degradation of HOXB4.

The cardinal feature of HOXB4, which makes it interesting for clinical use, is its ability to promote HSC self-renewal. While this functionality can only be unequivocally confirmed using *in vivo* assays, such as CRU-assay, long-term *in vitro* cultures of hematopoietic cells can be used to provide some indication of the self-renewal capability of cultured cells. We have used clonal re-plating of CFU-GEMM, where we assumed that appearance of secondary GEMM colonies would indicate self-renewal activity of original progenitor that gave rise to primary colony. As expected, re-plating the GEMM colonies expressing wt-HOXB4 resulted in the appearance of secondary GEMM, while none were detected in control cultures. The occurrence of secondary GEMM colonies with cultures expressing m-HOXB4 indicates that point mutations in first 31AA of molecule did not affect its ability to promote self-renewal at a multipotent progenitor level. Significantly greater

numbers of overall secondary colonies (Figure 4B) further shows that the progenitors expressing mutated HOXB4 proteins are as competent in generating progeny as those expressing wt protein. Differential analysis of secondary cultures showed a decreased frequency of granulocytic (CFU-G) colonies with 1426 and 1427 mutant compared to wt-HOXB4 and 1423 mutant (Figure 5A), which can be correlated with decreased overall mature myeloid output by progenitors expressing these two mutants. This is further confirmed by the analysis of CFU-GM colonies' cellularity. The output from bi-potent myeloid progenitors was drastically reduced with 1426 and 1427 m-HOXB4 compared to wt and 1423 m-HOXB4 and has not been better than the output of control, GFP expressing, progenitors. This indicates that while primitive CFU-GEMM progenitors expressing those two mutants have been able to both, self-renew (indicated by generating secondary multipotent progenitors) their output of more differentiated, bi-potent progenitors and finally differentiated cells has been affected. This effect of 1426 and 1427 mutants on hematopoietic progenitors was further confirmed by long-term culture of CFU-GEMM progeny, where each colony was serially expanded through 4 consecutive passages. Only colonies arising from wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 expressing GEMM progenitors were capable of supporting such expansion, and cultures initiated from 1426 and 1427 m-HOXB4 expressing progenitors differentiated and died at a rate similar to controls. These results indicate that while 1426 and 1427 m-HOXB4 do support similar expansion of hematopoietic cells than wt- HOXB4, the mutations might negatively affect the long-term expansion capability of more

primitive progenitors. Further *in vivo* experiments are in progress to confirm these results and analyze other mutants.

Together results presented herein show that 3 point mutations in the first 31AA of HOXB4 not only stabilize the molecule, but also change its biological activity. While the short term effect on hematopoietic progenitors is similar to that of wt-HOXB4, longer term cultures and selective pressure towards expansion showed, that at least 2 of the mutations do impair the ability of progenitors to support continuous production of cells required to support the culture. These results are not only of interest for the clinical usage of this molecule, but also provide the first data with regard to functional importance of HOXB4 domains in different biological processes.

Figure Legends

Figure 1. Overexpression of wt- and mutant HOXB4 results in increased frequency of myeloid clonogenic progenitors. BM cells from mice injected with 5-FU were infected with retroviruses carrying indicated HOXB4 variants and tagged with GFP (m-HOXB4) and YFP (wt-HOXB4), or GFP only (control). Cells were sorted for GFP expression, plated in standard methyl-cellulose culture, which was scored 9-10 days later. **A)** All HOXB4 variants have induced similar enhancement in clonogenic progenitor frequency over the control ($p < 0.0001$). In addition expression of 1426 mutant resulted in a significantly greater number of CFC compared to wt-HOXB4 (§ $p < 0.05$) and 1427 m-HOXB4 (§§§ $p < 0.001$). **B)**

There was no significant difference in the frequency of erythroid colonies (BFU-E), between control (GFP) and HOXB4 expressing cultures. On the other hand, frequencies of all types of myeloid colonies were significantly enhanced with all HOXB4 variants compared to the control and in addition, expression of 1426 m-HOXB4 induced a significantly elevated frequency of CFU-G, CFU-GMb and CFU-GMs compared to other HOXB4 variants (**B and C**). Results are mean of 7 independent experiments \pm SE. *** $p < 0.0001$ control vs HOXB4, §§§ $p < 0.0001$ as indicated, § $p < 0.05$ as indicated.

Figure 2. GM colonies over-expressing wt-HOXB4 are larger compared to both colonies arising from m-HOXB4 expressing cells and control. BM cells were infected with wt-HOXB4 and mutants and control viruses and plated in methyl cellulose. The GM colonies arising from wt-HOXB4 infected cells (outlined) were visually larger compared to colonies from other cultures.

Figure 3. Overexpression of HOXB4 provides a growth advantage for myeloid progenitors. GM colonies were aspirated from semi-solid media and the number of cells in each was evaluated using a cell number evaluation kit as described in Materials and methods. Both, wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 expression resulted in colonies containing a significantly greater number of cells compared to control ($p < 0.0001$). In addition wt-HOXB4 expressing colonies were more cellular compared to those produced by 1426 m-HOXB4 (§ $p < 0.05$), while 1423 m-HOXB4 induced larger colonies compared to both other mutants (1426 and 1427, §§ $p < 0.01$ and § p

< 0.05, respectively). GM colonies derived from 1426 m-HOXB4 expressing cells were not significantly larger than control. Results are expressed as mean of 3 experiments \pm SE.

Figure 4. HOXB4 induces an increased frequency of secondary colonies. CFU-GEMM colonies were aspirated from methyl cellulose, cells dissociated by repeated washing and each colony then plated in separate semi-solid dishes. Resulting colonies were then scored 10-11 days later. **A)** Wt- or m-HOXB4 expressing cells from primary GEMM colonies contained several CFU-GEMM that produced secondary multipotent colonies, while cells from control primary GEMM colonies lacked that capacity. **B)** All multipotent colonies arising from wt- and 1423 m-HOXB4 expressing primary GEMM contained significantly larger number of progenitors capable of producing secondary colonies. Results are mean \pm SE of 8 independent experiments. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$.

Figure 5. Wt- and m-HOXB4 increased the production of myeloid progenitors from multipotent progenitors. Similarly to results from primary cultures of infected BM cells (Figure 1), the difference in number of progenitors contained in GEMM colony between HOXB4 and control cells is confined to the myeloid lineage. **A)** Expression of wt- or m-HOXB4 induced a significant increase in granulocytic monocyte-lineage progenitors compared to control ($p < 0.0001$). In addition, 1423 m-HOXB4 expression resulted in significantly greater number of G

colonies compared to other two mutants (§§ $p < 0.01$ and § $p < 0.05$ vs 1426 and 1427 m-HOXB4, respectively). **B)** The number of small bi-potent GM colonies (considered more mature) was significantly enhanced with cultures expressing all HOXB4 variants compared to control ($p < 0.0001$). In addition, there was a difference between the number of GMs colonies arising from 1423 m-HOXB4 expressing cells and 1427 m-HOXB4 expressing cells (§ $p < 0.05$). Surprisingly, only wt-HOXB4 expressing primary GEMM colonies contained significantly more CFU-GMb (considered more primitive) compared to control GEMM colonies ($p < 0.05$). The results are mean \pm SE of 8 independent experiments.

Figure 6. Overexpression of wt-HOXB4 and 1423 m-HOXB4 results in increased cellularity of myeloid colonies after replating the GEMMs. The cellularity of GM colonies arising from primary GEMM colonies was evaluated as explained in materials and methods. Both wt- and 1423 m-HOXB4 induced significantly larger colonies compared to control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ for wt and 1423 m-HOXB4 vs control, respectively). In addition, wt-HOXB4 induced larger colonies compared to 1427 m-HOXB4 (§ $p < 0.05$), while 1423 m-HOXB4 induced colonies that were larger compared to both other mutants (§§§ $p < 0.0001$). Results are expressed as mean \pm SE of 4 independent experiments.

Figure 7. wt- and 1423 m-HOXB4 expressing cells contained in GEMM progenitors are capable of supporting long-term culture and expansion. GEMM colonies from 6-7 day old semi-solid cultures of infected BM cells were

aspirated and clonally plated in liquid media and passaged when reaching confluence as described in materials and methods. **A)** Only cells from GEMM colonies arising from wt- or 1423 m-HOXB4 were capable of supporting long term expansion ($p < 0.01$ compared to 1426 m-HOXB4 and control curve, and $p < 0.05$ compared to 1423 m-HOXB4 curve). **B)** wt- and 1423 m-HOXB4 reached confluency at passage #3 significantly faster compared to 1427 m-HOXB4 ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm SE of 3 independent experiments.

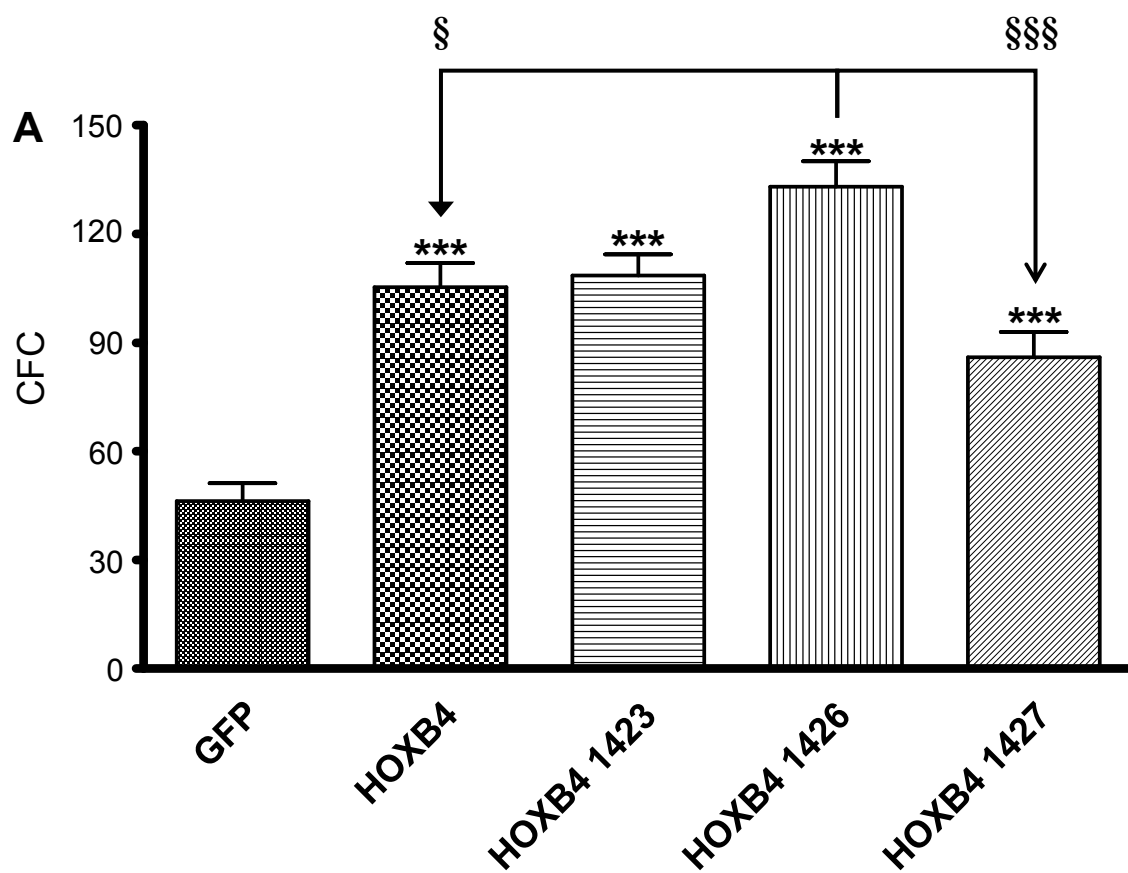


Figure 1A

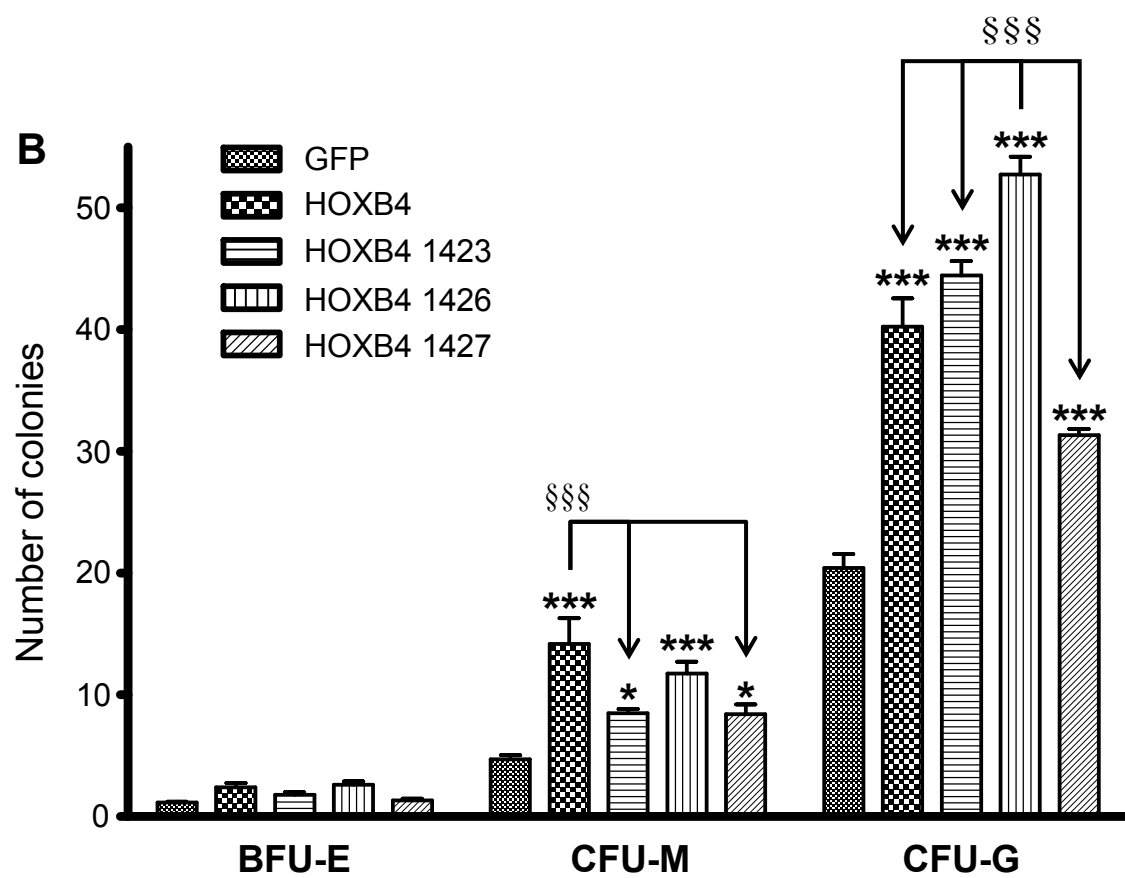


FIGURE 1B

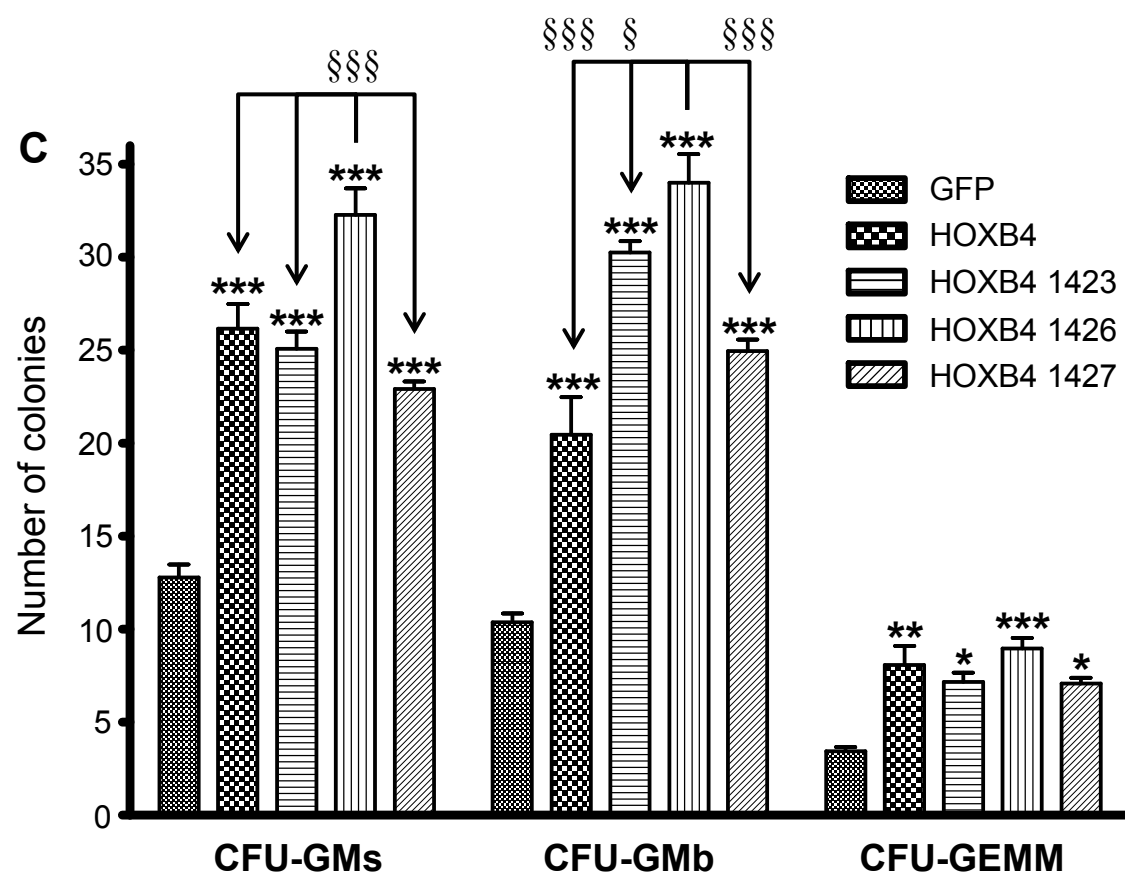


FIGURE 1C

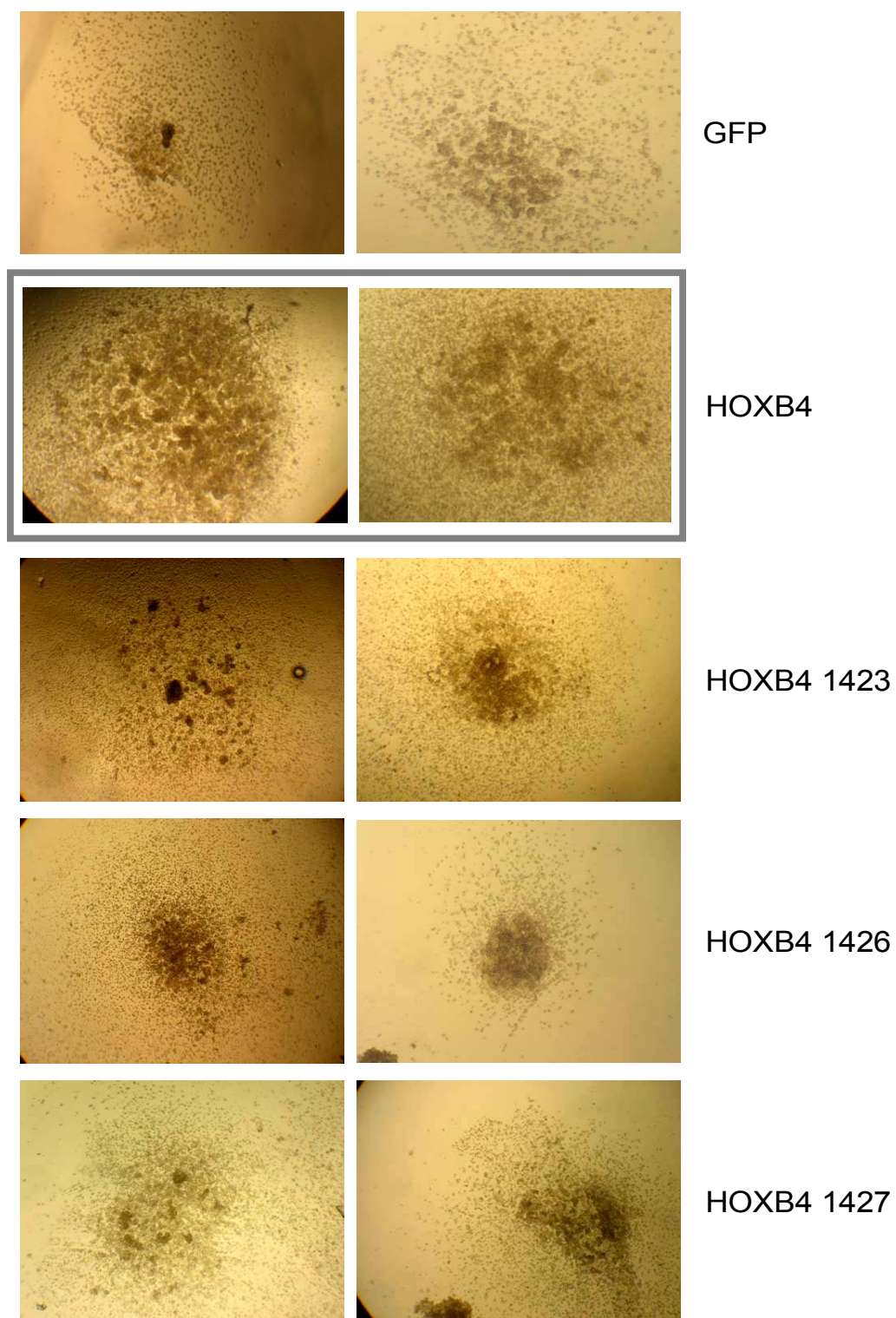
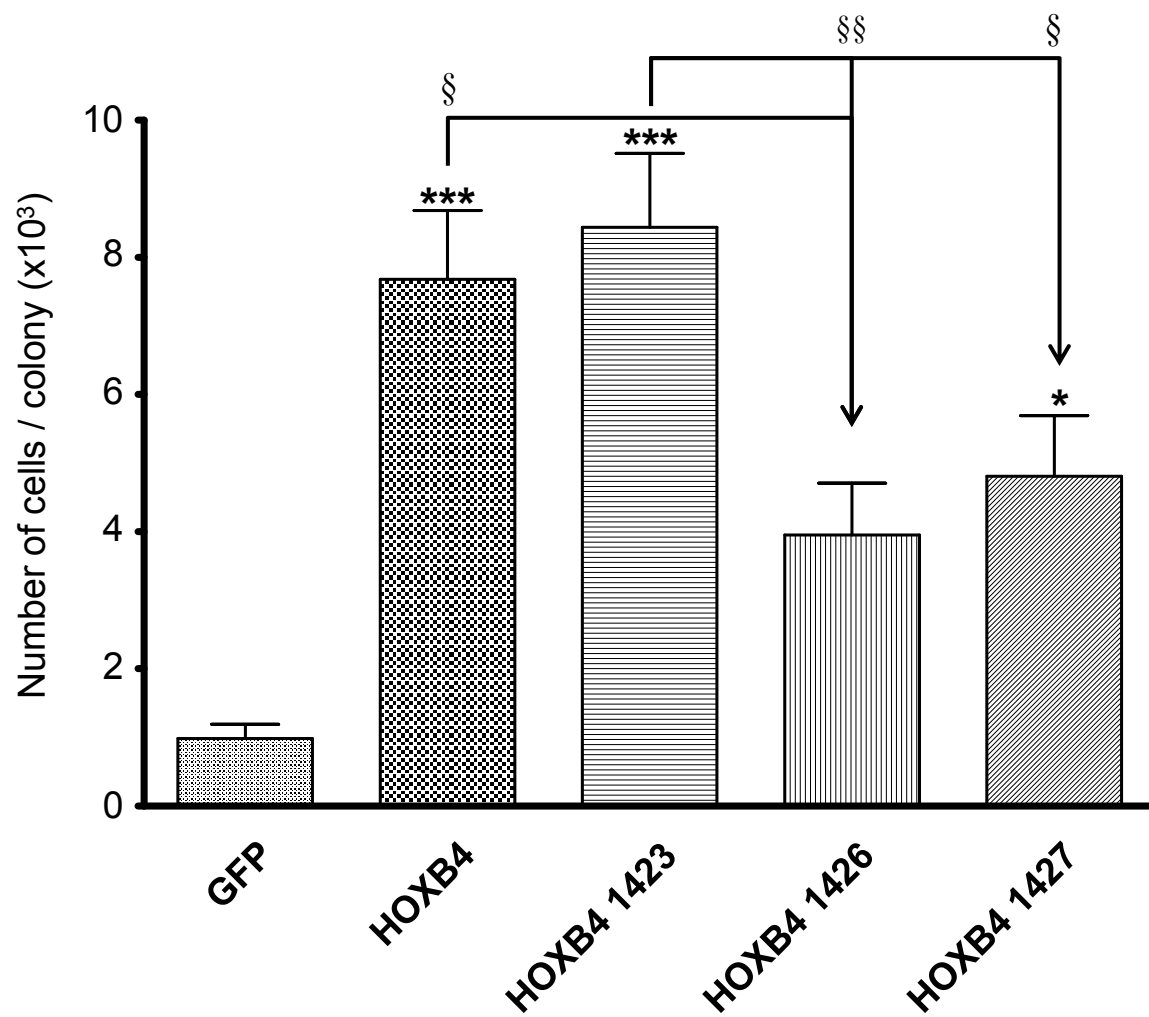


FIGURE 2

**FIGURE 3**

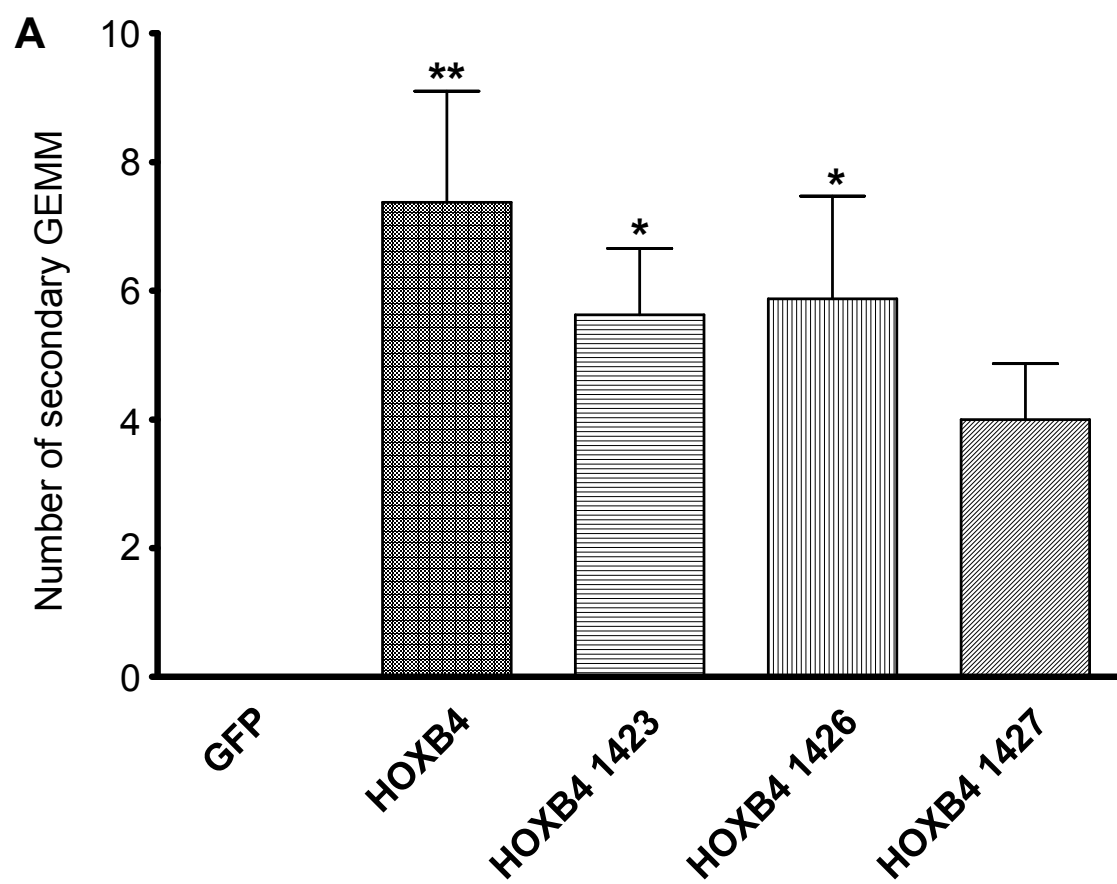
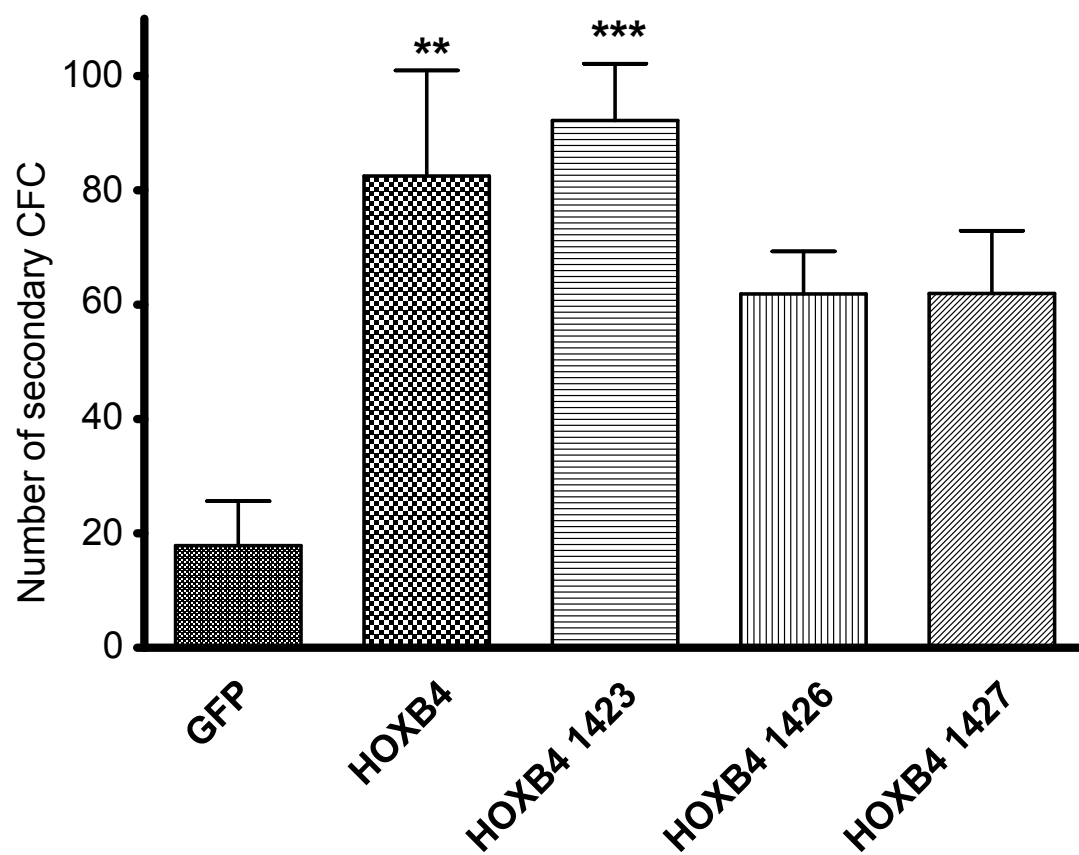


FIGURE 4A

**FIGURE 4B**

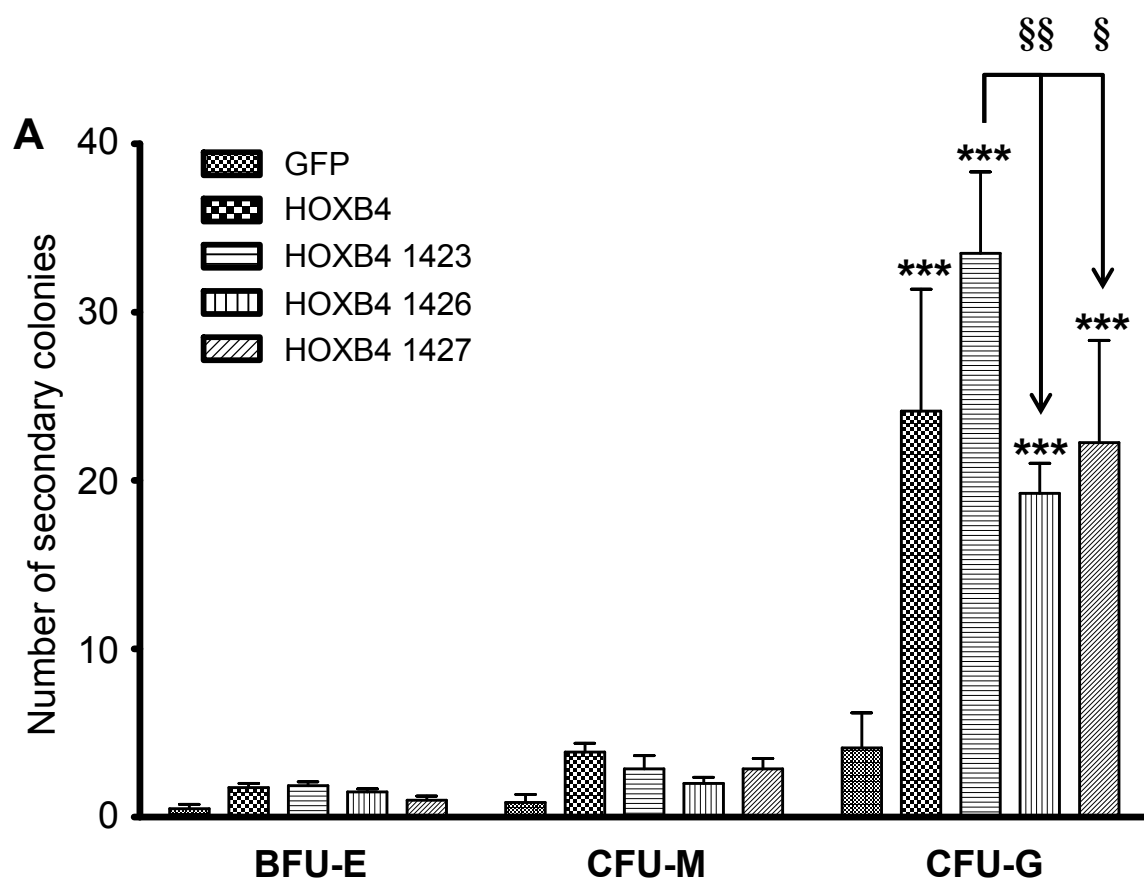


FIGURE 5A

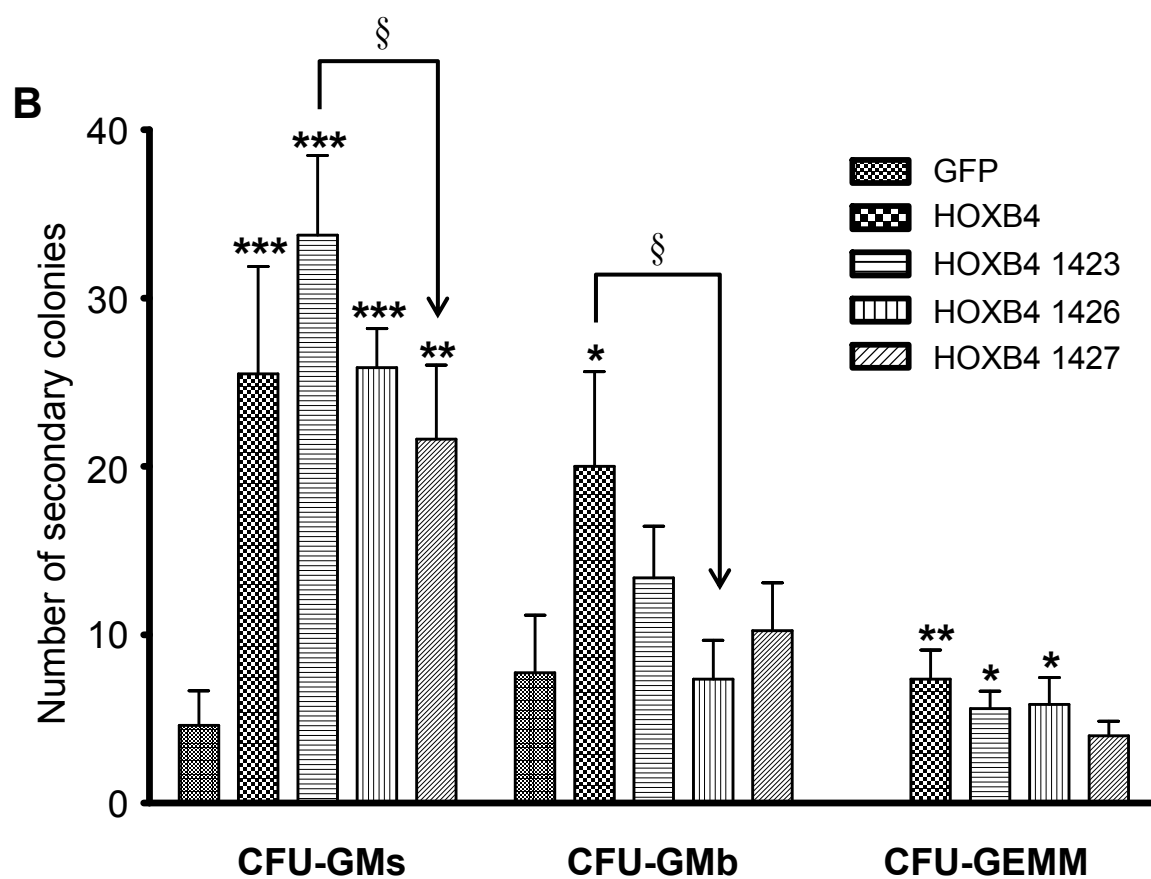
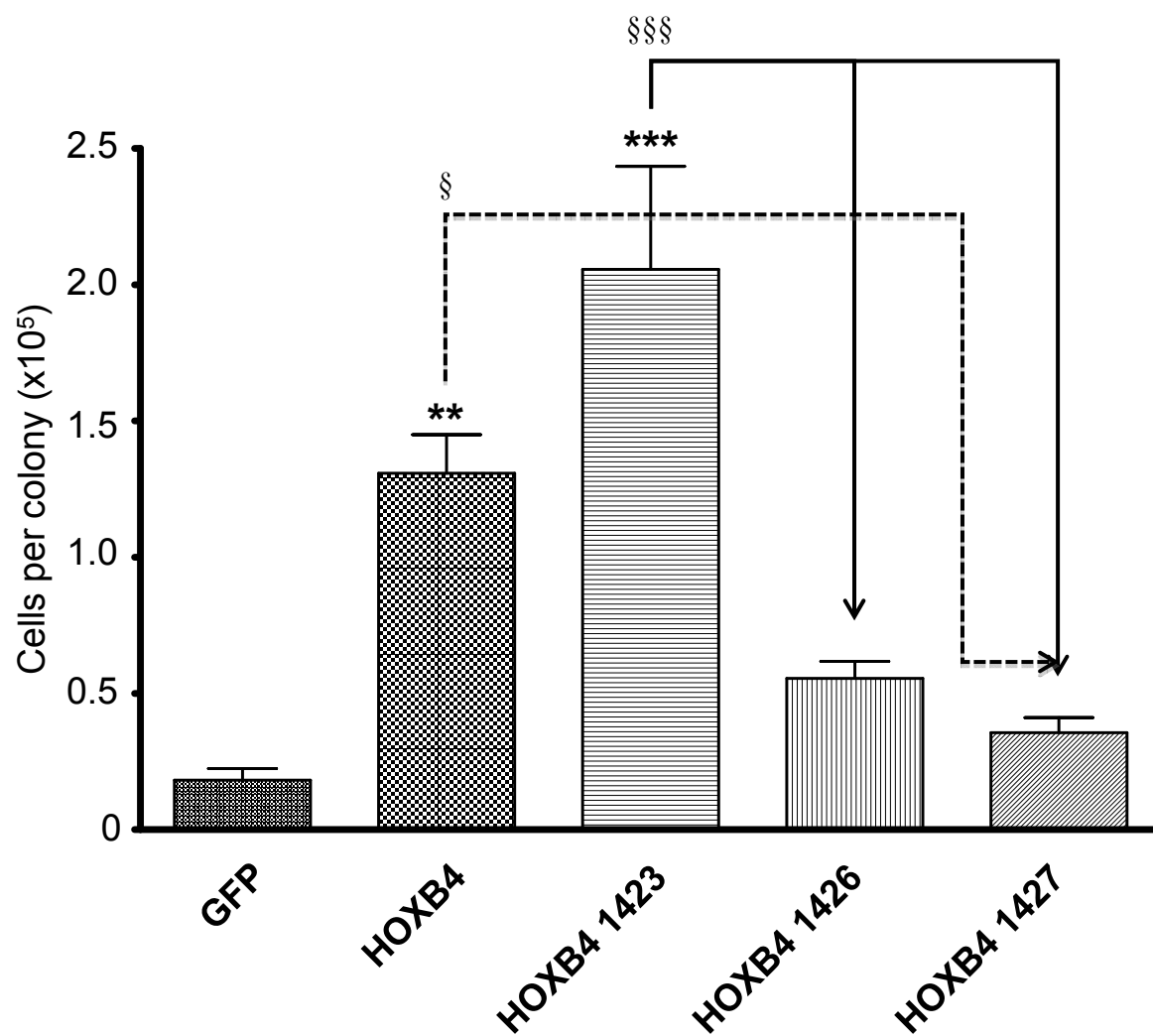


FIGURE 5B

**FIGURE 6**

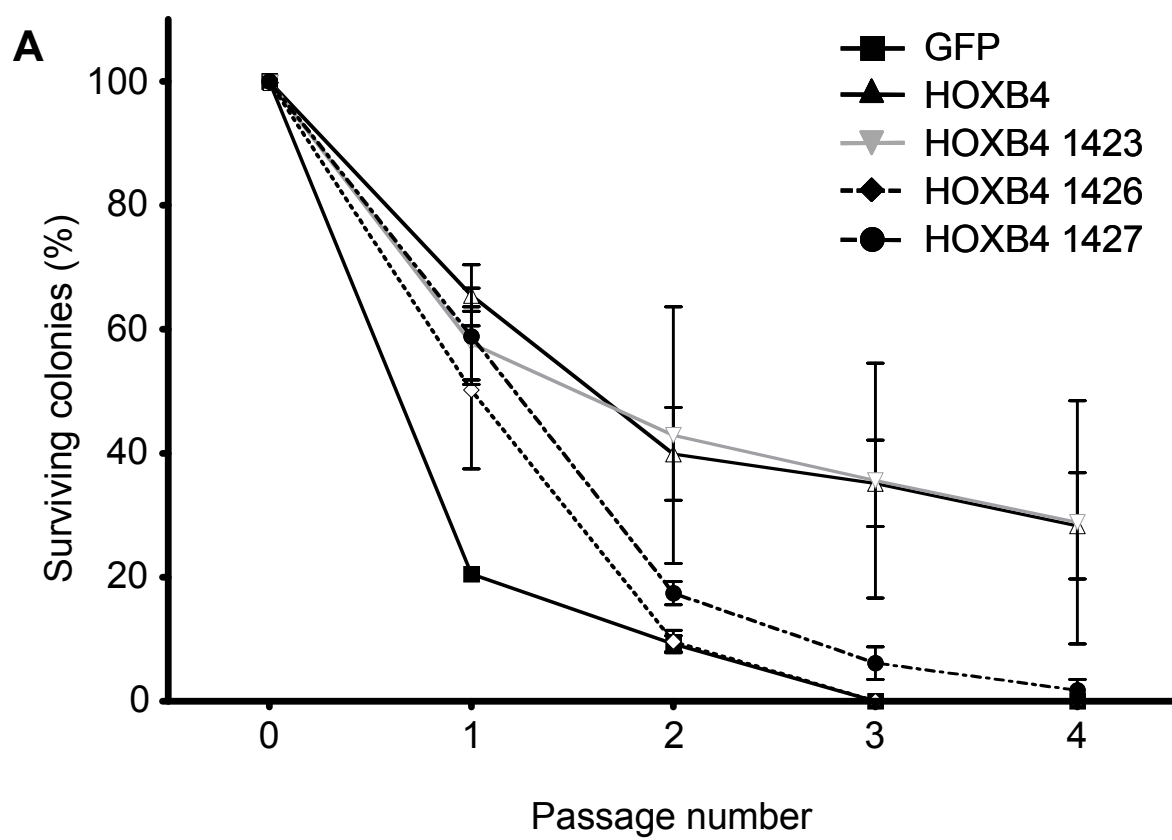


FIGURE 7A

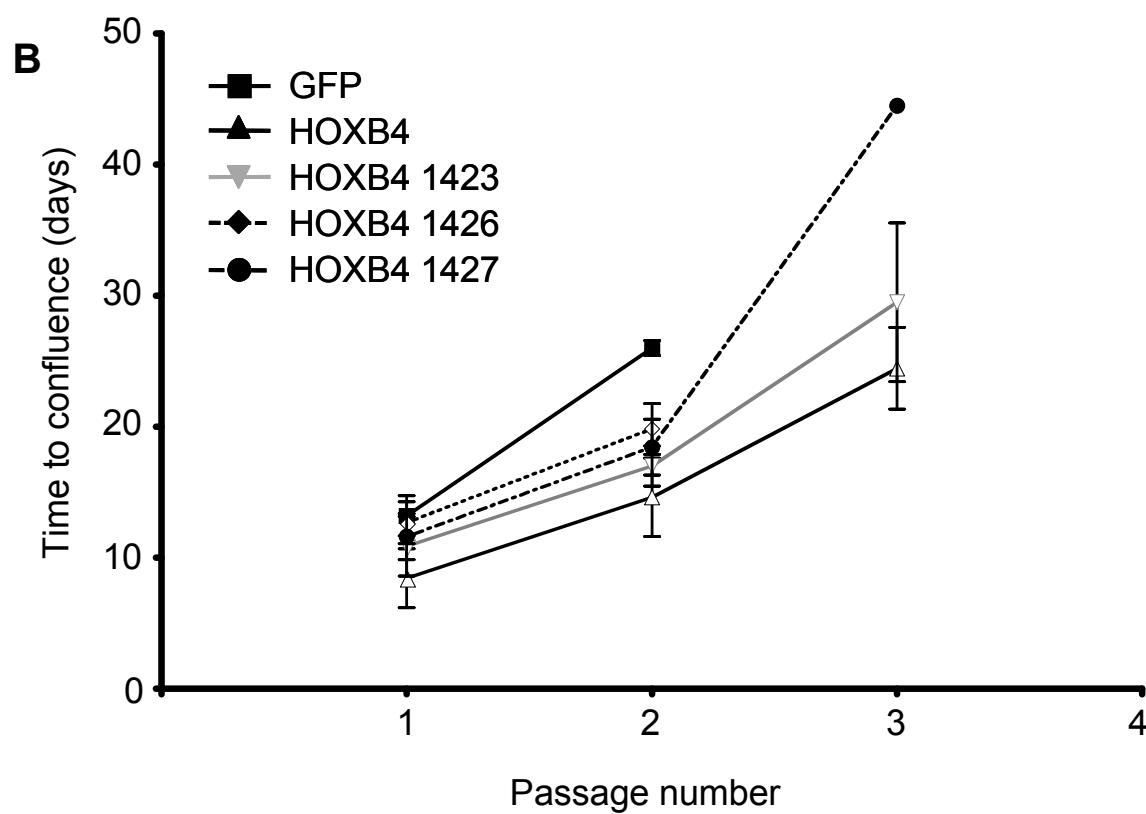


FIGURE 7B

Reference List

- (1) Wilson A, Laurenti E, Oser G et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135:1118-1129.
- (2) Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 1996;88:2852-2858.
- (3) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol*. 2001;29:1125-1134.
- (4) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*. 2002;109:39-45.
- (5) Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34⁺ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12223-12227.
- (6) Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*. 1995;9:1753-1765.
- (7) Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2004;23:7223-7232.

- (8) Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*. 1999;94:2605-2612.
- (9) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001;2:172-180.
- (10) Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192:1365-1372.
- (11) Murdoch B, Chadwick K, Martin M et al. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3422-3427.
- (12) Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
- (13) Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*. 2000;6:1278-1281.
- (14) Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood*. 2003;101:1784-1789.
- (15) Willert K, Brown JD, Danenberg E et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003;423:448-452.

- (16) Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* 2003;9:1423-1427.
- (17) Krosl J, Austin P, Beslu N et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med.* 2003;9:1428-1432.
- (18) Krosl G., Giard MP, Roy DC. Ex vivo expansion of human SCID-repopulating cells using recombinant TAT-HOXB4 protein. Unpublished Work
- (19) Krosl G, Giard MP, Krosl J et al. Ex Vivo Expansion of Human SCID-Repopulating Cells Using Recombinant TAT-HOXB4 Protein. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2005;106:3159.
- (20) N.Beslu and Sauvageau G. The N-terminal region of Hoxb4 protein is required for proteasome-mediated degradation. Unpublished Work
- (21) Beauchemin S., Krosl G., Beslu N., Krosl J., Sauvageau G . Ectopic expression of mutated HOXB4 proteins with increased intracellular stability affects both long and short term hematopoietic reconstitution. Unpublished Work
- (22) Schiedlmeier B, Klump H, Will E et al. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood.* 2003;101:1759-1768.
- (23) Pilat S, Carotta S, Schiedlmeier B et al. HOXB4 enforces equivalent fates of ES-cell-derived and adult hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12101-12106.

- (24) Beslu N, Krosl J, Laurin M et al. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood*. 2004;104:2307-2314.
- (25) Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J*. 2001;20:350-361.
- (26) GraphPad Prism 4- Statistics Guide. 2004.
- (27) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245.
- (28) Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem*. 1995;270:4955-4958.
- (29) Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:21-30.
- (30) Beslu N, Krosl J, Laurin M et al. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood*. 2004;104:2307-2314.
- (31) Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood*. 2002;100:862-868.
- (32) Magli MC, Barba P, Celetti A et al. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6348-6352.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

10. Discussion

La transplantation des CSH représente une thérapie du futur pour traiter plusieurs maladies néoplasiques comme les leucémies, les lymphomes, les myélomes, etc. Cependant, le nombre limité de cellules souches représente un problème majeur pour plusieurs patients atteints de ces conditions. De plus, l'utilisation de cellules souches pour la régénération tissulaire suite à des dommages cellulaires importants comme ceux retrouvés après un infarctus du myocarde, par exemple, souligne l'importance de l'accès aux cellules souches et aussi la difficulté d'approvisionnement en de telles cellules souches. Ces besoins significatifs en cellules souches ne peuvent être comblés de façon efficace qu'en identifiant des facteurs candidats pour augmenter le nombre de CSH disponibles.

Notre intérêt s'est donc tourné vers le facteur de transcription HOXB4 qui s'est avéré un facteur très important pour l'autorenouvellement des CSH.^{79;80;82;83}. En particulier, ce projet de maîtrise a permis d'évaluer l'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes *in vitro*.

10.1. Pertinence du projet

Le problème principal avec la protéine HoxB4 est sa demi-vie qui est très courte. De façon à faciliter l'utilisation clinique de TAT-HOXB4, il serait utile que cette protéine soit stable plus longtemps. Cela diminuerait les besoins d'addition de HOXB4 à la culture cellulaire, ce qui réduirait le risque de contamination par des

agents infectieux et faciliterait le processus d'expansion des CSH. Trois formes mutantes de la protéine HOXB4 ont démontré une meilleure stabilité de la protéine et suite à la transplantation des CSH infectées par ces mutants à des souris, l'expansion des CSH ressemblait à celle des CSH infectées avec HOXB4 sauvage.

Dans le présent projet, les objectifs principaux étaient d'étudier les effets de s-HOXB4 et de ses mutants sur la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes. Les effets de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes ont été mesurés sur les cellules progénitrices relativement matures de la lignée myéloïde que sont les CFU-GEMM et leur progénie, de même que les CFU-GEMM dotés d'autorenouvellement.

10.2. But du projet et résultats obtenus

Nous avons vérifié, au cours de cette étude, l'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes. Notre hypothèse était que les cellules progénitrices myéloïdes exprimant s-HOXB4 prolifèrent plus rapidement que les cellules contrôles ou exprimant les mutants HOXB4 et/ou qu'une seule CSH va générer plus de cellules progénitrices myéloïdes exprimant s-HOXB4 que les cellules contrôles ou exprimant les trois m-HOXB4.

Dans la première partie du projet, nous avons démontré que s-HOXB4 et m-HOXB4 causent une augmentation du nombre total de cellules progénitrices myéloïdes et qu'ils augmentent aussi la proportion des colonies myéloïdes par

rapport aux colonies érythroïdes. Nos résultats démontrent que les colonies CFU-GM plus primitives exprimant s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 contiennent plus de cellules myéloïdes matures si on les compare aux cellules contrôles ou les deux autres mutants HOXB4.

La seconde partie du projet a permis de démontrer pour la première fois que les cellules progénitrices GEMM qui surexpriment HOXB4 sauvage et aussi les cellules progénitrices GEMM qui surexpriment le mutant 1423 ont une plus grande capacité d'autorenouvellement par rapport aux cellules contrôles et aux deux autres mutants qui ne conservent pas cette propriété.

En dernier lieu, nous avons démontré qu'une plus grande proportion de GEMM s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 survivent à long terme lors d'expansions successives en culture liquide. Ces données sont nouvelles car peu d'études ont évalué l'effet de HOXB4 sur les cellules progénitrices myéloïdes. De plus, aucune étude n'avait évalué le potentiel oncogénique à la protéine HOXB4, initialement effectuées pour en augmenter la stabilité, sur la prolifération des cellules progénitrices matures.

11. L'effet de HOXB4 sur l'expansion des cellules progénitrices myéloïdes *in vitro*

Plusieurs études ont démontré que le nombre de cellules progénitrices progéniteurs hématopoïétiques augmente significativement quand ces dernières surexpriment HOXB4 *in vitro* comparativement au contrôle (avec de cellules murines de moelle osseuse, mais aussi avec de cellules humaines de sang cordon)^{103;104;107;110;133}. Les études initiales^{69;103} avaient déterminé que les cellules progénitrices clonogéniques exprimant HOXB4 donnaient naissance aux colonies myéloïdes, érythroïdes et myéloïdes/érythroïdes en milieu semi-solide.

Dans la présente étude, nous avons comparé la capacité de prolifération des cellules progénitrices myéloïdes exprimant HOXB4 sauvage avec celle des cellules contrôles ou cellules exprimant les différentes formes mutantes de la protéine HOXB4. Nous avons comparé l'expansion des cellules progénitrices hématopoïétiques générées à partir d'un nombre bien défini de cellules triées et aussi en mesurant la taille des colonies cellulaires. Les essais clonogéniques ont démontré que s-HOXB4 et m-HOXB4 augmentaient significativement le nombre total de cellules progénitrices myéloïdes et qu'ils augmentaient aussi la proportion des toutes les sous-populations des autres types de cellules progénitrices (BFU-E, CFU-G, CFU-GM, etc.). Thorsteinsdottir¹⁰⁴ avait aussi observé aussi une augmentation de 5 fois du nombre des cellules progénitrices myéloïdes qui provenaient de cellules de la moelle osseuse infectées avec HOXB4 et puis mise en culture dans un milieu de méthylcellulose. Donc, nous avons un nombre plus

important de cellules progénitrices myéloïdes lorsque HOXB4 (sauvage et mutée) est surexprimé *in vitro* et aucune sous-population n'est favorisée par HOXB4.

Nos résultats ont aussi démontré que les CSH qui surexpriment s-HOXB4 ou le mutant 1423 donne naissance à des colonies GM plus grandes et plus primitives que celles observées avec la surexpression des deux autres mutants HOXB4. Ces résultats concordent avec d'autres études⁷⁹ qui avaient aussi observé de plus grandes colonies GM dans le groupe HOXB4 comparativement au groupe contrôle. Tous ces résultats suggèrent que les colonies GM plus primitives s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 produisent plus de cellules myéloïdes matures si on les compare aux cellules contrôles ou les deux autres mutants HOXB4.

On peut spéculer que les proportions plus élevées des cellules myéloïdes dans les souris transplantées avec les CSH qui surexpriment HOXB4 sauvage pourraient être attribuable à une proportion élevée de cellules progénitrices myéloïdes dans la moelle osseuse. . Il est aussi possible que le nombre de cellules par colonies expliquent l'accumulation des cellules myéloïdes lorsque HOXB4 sauvage est surexprimé. D'autres études ont démontré que, *in vivo*, les proportions entre la population myéloïde et lymphoïde étaient similaires dans tous les organes soit la MO, la rate, le thymus et le sang périphérique dans des souris transplantées avec des CSH qui surexprimaient HOXB4 sauvage⁸⁰, mais cet effet était observé seulement après une longue période de temps après la transplantation. Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'effet de HOXB4 sur les cellules progénitrices myéloïdes à des temps plus courts après la transplantation (14-20 semaines). Nous avons ainsi observé, après 14 semaines, un nombre plus important

de cellules myéloïdes dans le sang de souris transplantées avec des CSH surexprimant HOXB4 sauvage. De même, d'autres études^{79,80} ont observé un effet semblable dans le sang et la rate des souris transplantées avec des CSH surexprimant HOXB420 semaines après la greffe.

Donc, dans cette partie du projet nous avons démontré que s-HOXB4 augmentaient significativement le nombre et la proportion des colonies myéloïdes *in vitro* et *in vivo*. De façon similaire, cet effet est aussi observé avec le mutant HOXB4 1423.

12. Les cellules progénitrices GEMM possèdent une plus grande capacité de s'autorenouveler quand ils surexpriment HOXB4 sauvage ou son mutant 1423

Une des plus importantes propriétés qui caractérisent une CSH est sa capacité de s'autorenouveler¹⁷. Plusieurs études ont démontré que HOXB4 est un facteur très important pour l'autorenouvellement des CSH.^{79;80;82;83} Nous avons démontré que les cellules progénitrices GEMM, les cellules progénitrices les plus primitives que l'on puisse analyser *in vitro*, sont capables d'autorenouvellement lorsqu'elles surexpriment HOXB4 sauvage ou les trois mutants HOXB4.

Des études précédentes⁷⁹ avaient démontré que les colonies qui surexprimaient HOXB4 étaient capable de générer deux à trois fois plus de colonies secondaires après un second réensemencement comparativement à des colonies contrôles. Un autre groupe⁸⁶ a trouvé une augmentation de 5 fois du nombre total de cellules progénitrices lorsque les cellules CD34⁺ de sang cordon humain surexprimaient HOXB4 comparativement aux cellules contrôles. Dans ces études, ils ont utilisé toutes les colonies primaires dans le méthylcellulose. Dans notre étude, nous avons réensemencé seulement les colonies les plus primitives (GEMM) et ainsi nous avons démontré que l'effet de HOXB4 sauvage et des mutants HOXB4 affectaient les cellules primitives au cours de l'hématopoïèse. Nous avons aussi observé que lorsque la colonie GEMM surexprimait HOXB4 sauvage ou une des protéines mutantes HOXB4, cette colonie était capable de générer tous les type de cellules progénitrices des différentes lignées

hématopoïétiques lorsqu'on la réensemencait dans un second pétri de méthylcellulose, En effet, les GEMM sont capables de se différencier et ils donnent naissance à toutes les cellules progénitrices granulocytaire, érythroïdes, monocytaires et mégacaryocytaires³⁷ et aussi à d'autres GEMM puisqu'ils sont capables d'autorenouvellement. En conclusion, nous avons démontré pour la première fois que les cellules progénitrices GEMM qui surexpriment HOXB4 sauvage ou le mutant 1423 ont une plus grande capacité de s'autorenouveler si on les compare avec les cellules contrôles qui, elles, ne sont pas capables de s'autorenouveler comme les deux autres mutants HOXB4.

Ces mêmes expériences, nous ont permis d'observer que les colonies GM plus primitives étaient plus grandes et donc qu'elles contenaient un plus grand nombre de cellules lorsqu'elles surexprimaient HOXB4 sauvage ou le mutant HOXB41423 après un réensemencement de colonies GEMM comparativement aux colonies GM contrôles et exprimaient les autres formes mutantes de la protéine HOXB4. De plus, Sauvageau et al.⁷⁹ ont observé, qu'environ 30% des colonies qui surexprimaient HOXB4 étaient plus grandes en taille (>1000 cellules/colonie) après un réensemencement de colonies totales comparativement au contrôle. Tous ces résultats suggèrent que les colonies GM plus primitives s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 produisent un nombre plus important de cellules myéloïdes matures après un réensemencement de colonies GEMM si on les compare aux cellules contrôles ou aux deux autres mutants HOXB4.

Nos études ont aussi permis de démontrer que les CFU-GEMM qui exprimaient HOXB4 sauvage ou le mutant 1423 possédaient une plus grande

capacité de s'autorenouveler. HOXB4 sauvage pourrait ainsi contribuer à tirer la balance vers la population myéloïde dans les souris transplantées avec des CSH qui surexpriment HOXB4 sauvage. Dans le cas de souris transplantées avec le mutant 1423 HOXB4 la balance presque normale entre la population myéloïde et lymphoïde pourrait être possiblement attribuable à des signaux de régulation qui sont présents *in vivo*. Les cellules progénitrices myéloïdes exprimant le mutant 1423 sont donc capables de répondre à ces signaux qui limite leur nombre *in vivo*, mais ce type de régulation est absent lorsque les CSH surexpriment HOXB4 sauvage.

Nous avons démontré que les cellules progénitrices GEMM qui surexpriment s-HOXB4 et m-HOXB4 avaient une capacité plus élevée de s'autorenouveler. Nous avons aussi démontré que les cellules progénitrices GM les plus primitives, qui proviennent directement des CFU-GEMM secondaires, conservaient la même capacité de proliférer que celles qu'elles avaient dans les cultures primaires. Les rôles de la protéine HOXB4 dans la production des cellules progénitrices hématopoïétiques plus primitives serait possiblement différent du rôle des autres gènes de la famille HOX. Par exemple, la surexpression de HOXB4 dans les cellules murines^{79;80} ou humaines⁸⁶ conduit à une augmentation du nombre de cellules progénitrices primitives à long terme, sans dépasser les mécanismes extrinsèques qui contrôlent le le nombre de CSH⁸² régule le nombre de cellules hématopoïétiques matures dans un modèle murin⁸⁰. Buske et al.⁸⁶ ont démontré que les colonies érythroïdes et myéloïdes avaient une morphologie normale quand ils surexprimaient HOXB4, en plus de démontrer que la réponse au stress était normale

(le réensemencement de colonies ne conduit pas à la génération de colonies secondaires blastiques). Cette découverte est contradictoire avec des données obtenues par l'étude de HOXA10¹²⁷. En effet, l'expression constitutive de HOXA10 offre davantage d'expansion myéloïde comparativement aux autres populations et induit aussi un blocage dans le développement des cellules B lymphopoïétiques¹²⁷ causant la formation de cellules blastiques *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, la surexpression rétrovirale des gènes HOXB3 induit également un blocage dans le développement lymphoïde de même qu'une myéloprolifération aberrante⁷⁶. Les mécanismes responsables de ces effets demeurent méconnus, mais la famille des gènes Tale et les cofacteurs des gènes HOX, Meis1 et Pbx1, semblent être impliqués. En effet, HOXB4 interagit seulement avec Pbx1 alors que HOXA10 peut interagir avec les deux cofacteurs Meis1 et Pbx1^{122;128}. De plus, au contraire de HOXB4 qui conduit à une différenciation érythroïde, la surexpression de HOXA5 prévient la différenciation érythroïde, ce qui cause l'apparition de cellules blastiques non différenciées¹²⁹. De surcroît, la surexpression des gènes HOXB7 a été associée à une prolifération des cellules blastiques *in vitro*, et ce, sans modifier le nombre total de cellules progénitrices hématopoïétiques¹³⁰. Les différents effets des gènes HOX sur les cellules progénitrices hématopoïétiques suggèrent que ces protéines pourraient activer ou désactiver des gènes cibles différents pendant l'hématopoïèse.

En conclusion, HOXB4 présente un potentiel intéressant pour une utilisation clinique afin d'induire une expansion des CSH. Même après un stress, la surexpression de HOXB4 n'induit pas de transformation maligne et favorise

l'autorenouvellement, en comparaison aux autres gènes HOX qui n'entraînent pas un tel effet.

En dernier lieu, nous avons démontré qu'une plus grande proportion des GEMM s-HOXB4 et m-HOXB4 1423 survivent à long terme lors de passages cellulaires successifs en culture liquide. Il est très important de noter qu'à court terme, il n'y a pas de différence entre HOXB4 sauvage et les formes mutantes de la protéine HOXB4, mais qu'à long terme, les cellules qui surexpriment HOXB4 sauvage ou le mutant 1423 conservent la capacité de s'expandre et de survivre. Le stress subi par les CSH pendant cette expérience est très important (plusieurs divisions cellulaires). Ces résultats sont en concordance avec d'autres études effectuées dans notre laboratoire qui ont démontré que HOXB4 sauvage était capable d'augmenter la réserve des CSH *in vivo* dans un modèle murin de transplantation en dilution limite (CRU = Competitive Repopulation Units), mais pas le mutant 1426 pour lequel l'expansion des CSH est comparable à l'expansion des cellules contrôles.

Plusieurs autres études ont démontré que la surexpression de HOXB4 induisait une récupération qui ramène les CRU à des niveaux normaux, ce qui n'est pas observé lorsque nous transplantons des cellules contrôles (non-HOXB4) à des souris qui ont reçu une dose d'irradiation létale. Cet effet est observé à des temps différents post-greffes, dès la douzième semaine après la greffe et ce nombre se maintient à 52 semaines après la greffe. ^{79;80;82;83;86;131} Il est très important de noter qu'après avoir atteint des niveaux normaux de CSH, mêmes après 52 semaines, ces niveaux ne sont pas dépassés, et ce malgré le fait que HOXB4 soit introduit de

façon stable dans les cellules. De plus, la surexpression de HOXB4 est associée non seulement à une augmentation du nombre de CRU mais aussi à une augmentation de la vitesse de reconstitution en CRU^{80;82}. Tous ces résultats démontrent que HOXB4 possède une fonction régulatrice du nombre de CSH et des cellules en découlant. Il s'agit d'une propriété importante de HOXB4 qui empêche la production incontrôlée de cellules hématopoïétiques qui joue possiblement un rôle crucial dans la préservation des CSH qui augmentent en nombre lorsque les stimuli appropriés sont présents, mais qui permet une rétroaction limitant l'épuisement de telles cellules^{80;82}. Il est important de noter que des résultats semblables ont aussi été obtenus avec des cellules humaines qui surexprimaient HOXB4 et qui avaient été injectées en dilution limite dans des souris NOD/SCID⁸⁶.

Il est particulièrement notable que l'effet de HOXB4 affecte plusieurs CRU, ce qui a été démontré par le fait que la régénération de pool de CSH est polyclonale même un an après la transplantation⁸². Cette observation est rassurante et en ligne avec l'absence d'induction de leucémie par HOXB4.

Notre étude des cellules progénitrices surexprimant HOXB4 offre des informations additionnelles sur le comportement des cellules progénitrices myéloïdes et ouvre des nouveaux horizons en clarifiant l'impact de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation des cellules de la lignée myéloïde. Ces informations seront utiles au développement de protocoles d'expansion des CSH avec HOXB4 et renforcent le bénéfice à court terme de HOXB4 sur la reconstitution hématologique.

13. Conclusions

Les travaux que nous avons effectués au cours de ce projet ont permis d'évaluer l'effet de HOXB4 sur l'expansion et la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes. Nos résultats ont démontré que l'expression de HOXB4 sauvage ou des mutants de la protéine HOXB4 permettaient d'augmenter le nombre total de cellules progénitrices myéloïdes *in vitro*.

Nous sommes le premier groupe à démontrer que la surexpression de s-HOXB4 dans les cellules progénitrices GEMM induit l'autorenouvellement des cellules progénitrices GEMM. Les cellules progénitrices GEMM qui surexpriment HOXB4 (sauvage ou mutants) sont aussi capables de se différencier en différents types cellulaires, et sont donc pluripotentes. Les cellules progénitrices GEMM contrôles qui ne surexpriment pas HOXB4 ne possède pas la capacité de s'autorenouveler.

Nos études démontrent aussi que les CFU-GEMM qui expriment HOXB4 sauvage ou son mutant 1423 possèdent une plus grande capacité de s'autorenouveler. Cette propriété pourrait aussi contribuer à faire varier la balance en faveur de la population myéloïde dans les souris transplantées avec des CSH qui surexpriment HOXB4 sauvage. Dans le cas des souris transplantées avec le mutant 1423 HOXB4, le maintien de l'équilibre entre les populations myéloïdes et lymphoïdes pourrait être attribuable à la capacité des cellules qui surexpriment le mutant HOXB4 à répondre aux signaux de la niche hématopoïétique qui régulent le nombre de cellules *in vivo*. Ainsi les cellules progénitrices myéloïdes qui expriment

le mutant 1423 auraient la capacité de supprimer leur prolifération alors que les cellules progénitrices myéloïdes exprimant HOXB4 sauvage verraient cette fonction altérée.

14. Perspectives

Il serait particulièrement intéressant de vérifier les mécanismes qui sont responsables de l'effet de HOXB4 sur les cellules progénitrices myéloïdes plus matures. Ceci pourrait impliquer des études du cycle cellulaire et de régulation de ce dernier. Il serait aussi utile de déterminer si HOXB4 a des effets sur la survie des cellules progénitrices ou alors si HOXB4 influencer les différentes étapes de la maturation myéloïde, érythroïde, monocyttaire et mégacaryocytaire.

Il serait aussi également important d'investiguer s'il existe une différence au niveau de la clonalité des cellules progénitrices qui surexpriment s-HOXB4 et m-HOXB4 (Southern Blot). L'étude corolaire à la présente est aussi l'investigation de l'effet de HOXB4 sur la production des cellules progénitrices lymphoïdes. Il est très important de déterminer si HOXB4 favorise la ligne myéloïde ou si il inhibe la différenciation lymphoïde ou les deux, et si oui, à quel niveau est ce blocage.

Aussi, il serait intéressant d'étudier le potentiel clinique du mutant 1423 HOXB4 puisqu'il préserve les cellules progénitrices plus immatures pour une longue période de temps, exactement comme le fait HOXB4 sauvage, mais la balance entre la population myéloïde et lymphoïde est presque normale dans le sang des souris transplantées avec le mutant 1423. Il faudrait donc savoir si ce mutant de HOXB4 permet une expansion importante des CSH et non seulement des cellules progénitrices hématopoïétiques.

Reference List

1. Weisdorf DJ. Bone marrow transplantation. What you need to know. Postgrad.Med. 1990;87:91-101.
2. Gratwohl A. Bone marrow transplantation today. Support.Care Cancer 1994;2:27-34.
3. van Bekkum DW. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. J.Leukoc.Biol. 2002;72:609-620.
4. Fruchtman S. Stem cell transplantation. Mt.Sinai J.Med. 2003;70:166-170.
5. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy Nature 2001;411:385-389.
6. Appleton AL, Sviland L. Pathogenesis of GVHD: role of herpes viruses. Bone Marrow Transplant. 1993;11:349-355.
7. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM et al. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. J.Immunol 2004;173:5467-5475.
8. Korngold R. Biology of graft-vs.-host disease. Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol. 1993;15:18-27.
9. Krenger W, Ferrara JL. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. Immunol Res. 1996;15:50-73.
10. Sullivan KM, Parkman R. The pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. Clin.Haematol. 1983;12:775-789.

11. Flowers ME, Kansu E, Sullivan KM. Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 1999.
12. Anasetti C, Hansen JA, Waldmann TA et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with humanized anti-Tac: an antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Blood* 1994;84:1320-1327.
13. Aractingi S, Carosella ED, Gluckman E. [Cutaneous manifestations of graft versus host reaction]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 1998;125:620-627.
14. Langley RG, Walsh N, Nevill T, Thomas L, Rowden G. Apoptosis is the mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host disease. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1996;35:187-190.
15. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 1991;324:667-674.
16. Saba N, Abraham R, Keating A. Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2000;36:27-48.
17. Lodish HF. *Molecular Cell Biology.* New York; 2003.
18. Donald Metcalf. *Blood lines ; An Introduction to Characterizing Blood Diseases of the Post-Genomic Mouse.* 2009. AlphaMed Press. Ref Type: Generic
19. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132:631-644.
20. Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K et al. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection?. *Exp.Hematol.* 2005;33:1029-1040.

21. Lessard J, Faubert A, Sauvageau G. Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* 2004;23:7199-7209.
22. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat.Rev.Immunol.* 2006;6:93-106.
23. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841-846.
24. Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425:836-841.
25. Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* 1998;92:4128-4137.
26. Maeno M, Mead PE, Kelley C et al. The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* 1996;88:1965-1972.
27. Schmid B, Furthauer M, Connors SA et al. Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development* 2000;127:957-967.
28. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 1995;9:2105-2116.

29. Kiel MJ, Radice GL, Morrison SJ. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* 2007;1:204-217.
30. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 2007;1:685-697.
31. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 2004;103:3258-3264.
32. Kiel MJ, Morrison SJ. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity*. 2006;25:862-864.
33. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology.(Bethesda.)* 2005;20:349-356.
34. Czechowicz A, Kraft D, Weissman IL, Bhattacharya D. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* 2007;318:1296-1299.
35. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* 2007;129:1097-1110.

36. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* 2007;129:1081-1095.
37. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.
38. Eaves C, Miller C, Cashman J et al. Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem Cells* 1997;15 Suppl 1:1-5.
39. Lemischka I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev.Clin.Exp.Hematol.* 2001;5:15-25.
40. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
41. Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp.Hematol.* 1999;27:1418-1427.
42. Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH. In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp.Hematol.* 1993;21:614-622.
43. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J.Exp.Med.* 1996;183:1797-1806.

44. Majka M, Ratajczak J, Machalinski B et al. Expression, regulation and function of AC133, a putative cell surface marker of primitive human haematopoietic cells. *Folia Histochem.Cytobiol.* 2000;38:53-63.
45. Wuchter C, Ratei R, Spahn G et al. Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping. *Haematologica* 2001;86:154-161.
46. Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC, Goodell MA. C. *Blood* 2008;111:2444-2451.
47. Hoffbrand A.V., Petit J.E. *Clinical Haematology*. Basle, New York: Sandoz Ltd, Gower Medical Publishing; 1988.
48. Zucali JR, Broxmeyer HE, Dinarello CA, Gross MA, Weiner RS. Regulation of early human hematopoietic (BFU-E and CFU-GEMM) progenitor cells in vitro by interleukin 1-induced fibroblast-conditioned medium. *Blood* 1987;69:33-37.
49. Siena S, Bregni M, Gianni AM. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 1999;12:27-39.
50. Efremidis AP, Koumakis G, Filis J et al. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) transplantation with a single apheresis in patients with lymphoma, myeloma and solid tumors. *Eur.J.Haematol.* 1996;57:269-277.
51. Mahe B, Milpied N, Hermouet S et al. G-CSF alone mobilizes sufficient peripheral blood CD34+ cells for positive selection in newly diagnosed patients with myeloma. *Br.J.Haematol.* 1996;92:263-268.

52. Siena S, Bregni M, Gianni AM. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 1999;12:27-39.
53. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp.Hematol.* 1991;19:226-231.
54. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A et al. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int.J.Cell Cloning* 1990;8 Suppl 1:76-89.
55. Christensen RD, Harper TE, Rothstein G. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates. *J.Pediatr.* 1986;109:1047-1051.
56. Haneline LS, Marshall KP, Clapp DW. The highest concentration of primitive hematopoietic progenitor cells in cord blood is found in extremely premature infants. *Pediatr.Res.* 1996;39:820-825.
57. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J.Exp.Med.* 2000;192:1281-1288.
58. Fraser CC, Eaves CJ, Szilvassy SJ, Humphries RK. Expansion in vitro of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cells. *Blood* 1990;76:1071-1076.
59. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 1999;94:2161-2168.

60. Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F et al. Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp.Hematol.* 2003;31:261-270.
61. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J.Clin.Invest* 2000;105:1013-1021.
62. Audet J, Miller CL, Rose-John S, Piret JM, Eaves CJ. Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:1757-1762.
63. Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:13648-13653.
64. Borge OJ, Ramsfjell V, Veiby OP et al. Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood* 1996;88:2859-2870.
65. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:9836-9841.

66. Buza-Vidas N, Antonchuk J, Qian H et al. Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev.* 2006;20:2018-2023.
67. Pestina TI, Cleveland JL, Yang C, Zambetti GP, Jackson CW. Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis. *Blood* 2001;98:2084-2090.
68. Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood* 2000;95:470-477.
69. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat.Med.* 2000;6:1278-1281.
70. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat.Immunol.* 2001;2:172-180.
71. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 1997;89:3624-3635.
72. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:12223-12227.

73. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994;78:191-201.
74. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2007;26:6766-6776.
75. Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. Homeodomain proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 1994;63:487-526.
76. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR et al. Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity*. 1997;6:13-22.
77. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol.Cell Biol.* 1997;17:495-505.
78. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U et al. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J.* 1998;17:3714-3725.
79. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 1995;9:1753-1765.
80. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 1999;94:2605-2612.
81. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* 2003;9:1423-1427.

82. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp.Hematol.* 2001;29:1125-1134.
83. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 2002;109:39-45.
84. Jan Jacob Schuringa, Edo Vellenga. Interactions between HSCs and their microenvironment .
85. Krosl J, Austin P, Beslu N et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med.* 2003;9:1428-1432.
86. Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 2002;100:862-868.
87. Schiedlmeier B, Klump H, Will E et al. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood* 2003;101:1759-1768.
88. Brun AC, Fan X, Bjornsson JM, Humphries RK, Karlsson S. Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34+ cells promotes myeloid differentiation but not proliferation. *Mol.Ther.* 2003;8:618-628.
89. Bjornsson JM, Larsson N, Brun AC et al. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol.Cell Biol.* 2003;23:3872-3883.

90. Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R et al. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* 2006;108:116-122.
91. Mann RS. The specificity of homeotic gene function. *Bioessays* 1995;17:855-863.
92. Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol.Cell Biol.* 1997;17:6448-6458.
93. DiMartino JF, Selleri L, Traver D et al. The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood* 2001;98:618-626.
94. Hisa T, Spence SE, Rachel RA et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J.* 2004;23:450-459.
95. Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 1990;60:547-555.
96. Nourse J, Mellentin JD, Galili N et al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 1990;60:535-545.
97. Thorsteinsdottir U, Kros J, Kroon E et al. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol.Cell Biol.* 1999;19:6355-6366.

98. Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO, Buchberg AM. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol.Cell Biol.* 1995;15:5434-5443.
99. Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA, Copeland NG. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet.* 1996;12:149-153.
100. Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W et al. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 2005;105:1456-1466.
101. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.
102. Nakamura T. NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. *Int.J.Hematol.* 2005;82:21-27.
103. Slape C, Aplan PD. The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk.Lymphoma* 2004;45:1341-1350.
104. Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp.Hematol.* 2002;30:49-57.
105. Imamura T, Morimoto A, Takanashi M et al. Frequent co-expression of HoxA9 and Meis1 genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement. *Br.J.Haematol.* 2002;119:119-121.

106. Cauwelier B, Cave H, Gervais C et al. Clinical, cytogenetic and molecular characteristics of 14 T-ALL patients carrying the TCRbeta-HOXA rearrangement: a study of the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia* 2007;21:121-128.
107. Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N et al. A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 2005;19:358-366.
108. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 2005;106:274-286.
109. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002;30:41-47.
110. Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS et al. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003;102:262-268.
111. Rozovskaia T, Feinstein E, Mor O et al. Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* 2001;20:874-878.
112. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133-143.

113. Fine BM, Stanulla M, Schrappe M et al. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:1043-1049.
114. Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S et al. Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;37:396-405.
115. Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K et al. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res.* 2003;63:4882-4887.
116. Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev.* 2003;17:2298-2307.
117. Horton SJ, Grier DG, McGonigle GJ et al. Continuous MLL-ENL expression is necessary to establish a "Hox Code" and maintain immortalization of hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res.* 2005;65:9245-9252.
118. Zeisig BB, Milne T, Garcia-Cuellar MP et al. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol.Cell Biol.* 2004;24:617-628.
119. Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J.* 2001;20:350-361.
120. Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol.Cell Biol.* 2004;24:1907-1917.

121. Pineault N, Abramovich C, Humphries RK. Transplantable cell lines generated with NUP98-Hox fusion genes undergo leukemic progression by Meis1 independent of its binding to DNA. *Leukemia* 2005;19:636-643.
122. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol.Cell Biol.* 2001;21:224-234.
123. Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. *Blood* 1998;92:4325-4335.
124. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004;5:738-743.
125. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:7521-7526.
126. Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:4086-4092.
127. Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 2001;97:2286-2292.
128. Buske C, Humphries RK. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int.J.Hematol.* 2000;71:301-308.

129. Crooks GM, Fuller J, Petersen D et al. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 1999;94:519-528.
130. Care A, Valtieri M, Mattia G et al. Enforced expression of HOXB7 promotes hematopoietic stem cell proliferation and myeloid-restricted progenitor differentiation. *Oncogene* 1999;18:1993-2001.
131. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2004;23:7223-7232.